

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

J. B. S. HALDANE: The Wilcoxon and Related Tests of Significance	205
K. W. BENTLEY and S. F. DYKE: The Structure of Isothebaine	205
S. FALLAB, MARGRITH SCHUSTER und H. ERLIENMEYER: Zur biologischen Bedeutung von Fe^{3+} und Cu^{2+} als Komplexbildner	207
H. BRANDENBERGER: A New Concept of the Alkaline Oxidation of Uric Acid	208
W. BOLLAG: Nachweis von organspezifischen Antikörpern	210
N. P. BUU-HOI, R. RIPS et R. ROYER: Activité tuberculostatique de certaines pyridazones	212
R. MEIER und F. KRADOLFER: Schutzwirkung von polysaccharidartigen Fraktionen bakterieller Herkunft bei einer experimentellen Virusinfektion	213
E. CUTOLO e F. REDUZZI: L'azione protettiva dell'acido tiotico nell'intossicazione da cianuro di potassio	214
A. APPARAO: The Role of pH in Nitrogen Utilization by <i>Piricularia oryzae</i>	215
R. LALLIER: Animalisation de l'œuf de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> par des substances polysulfoniques	217
ESRA GALUN: Effect of Seed Treatment on Sex Expression in the Cucumber	218
YONEZO SUZUKI: Studies on a Polyphenolase in <i>Scopolia japonica</i> III. On the Inhibition of DOPA Oxidation	219
R. TURPINI: Further Data on the Evaluation of Platelet Ac-globulin and its Plasmatic Origin	220
G. V. FEKETE and A. HEGYELI: Investigations on the ACTH-Protamine complex	222
P. MANDEL et Mme M. L. SCHMITT: Etude de l'activité adénosinetriphosphatase et hexokinase de cristallins de lapins soumis à une irradiation locale par les rayons X	223
MARIA ASSUNTA MOR: ATPase Activity of Guinea Pig Heart Muscle	224
J. ZAJICEK: Quantitative Determination of Acetylcholinesterase Activity in Individual Megakaryocytes at Various Stages of Maturation	226
J. SKOŘEPA and H. TODOROVICHOVÁ: Post-heparin Esterase in Man	228
P. BALINT, A. FEKETE, and S. SZALAY: Tubular Factors in the Renal Response to Arterial Hypotension	228
T. VINCENTS NISSEN: Actinomyces Antagonistic to <i>Polyporus annosus</i> Fr.	229
L. J. GRLIČ: Studies on the Ascorbic Acid and Carotene Content in Leaves as a Common Characteristic of Botanically Related Species	230
O. KUHN and H. O. HAMMER: Über die Einwirkung des Schilddrüsenhormons auf die Ossifikation	231
J. KUBIŠTOVÁ: Parathion Metabolism in Rat Liver and Kidney Slices	233
R. MEIER, H. J. BEIN und R. JAQUES: Antiallergische Wirkung bakterieller Polysaccharide	235

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

H. BIRKHÄUSER: Die Tuberkulose in ihrer Beziehung zu Individuum und Gesellschaft (Cogitationes)	236
W. STINGELIN: Eine neue morphologische Deutung des Vogelgehirns auf Grund neuer Forschungsergebnisse (Studiorum Progressus)	242
Congressus	244

EXPERIENTIA



L'EXPERIENTIA publiera:

- 1° des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
- 2° de *brèves communications*;
- 3° informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées*.

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse und Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.- pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.-. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S.A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.-, im Ausland sFr. 46.-.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $\frac{1}{1}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 77.-; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Telegraphmadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni*;
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports*;
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.- per la Svizzera; all'estero fr. 46.-. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $\frac{1}{1}$ pag. fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ pag. fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ pag. fr. 77.-; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Svizzera.

Casa editrice Birkhäuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.-; other countries fr. 46.-. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG. Basel

Verzeichnis der Inserenten - Liste des annonceurs - List of Advertisers - Experientia XII/6

Academic Press Inc., Publishers, New York
Birkhäuser Verlag, Basel

Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich

Sandoz AG., Basel
Steiner & Co., Basel

Sammlung Wissenschaft und Kultur

BAND 1 Die mathematische Denkweise. Von *Andreas Speiser*. 3. Auflage, 122 Seiten mit 11 Figuren und Notenbeispielen und 9 Tafeln. Ganzleinen Fr./DM 14.55 (1952).

BAND 2 Die Entwicklungsgeschichte der Chemie, eine Studie. Von *H. E. Fierz-David*. 2. Auflage, XV, 429 Seiten mit 106 Figuren und 24 Tafeln. Ganzleinen Fr./DM 24.95 (1952).

BAND 3 Geburt und Tod der Sonne. Von *George Gamow*. Deutsche Übersetzung von E. v. d. Pahlen. 302 Seiten mit 60 Figuren und 16 Tafeln. Ganzleinen Fr./DM 25.50 (1947).

BAND 4 Die Geschichte der Bauingenieurkunst. Ein Überblick von der Antike bis in die Neuzeit. Von *Hans Straub*. 300 Seiten mit 79 Figuren und 32 Kunstdrucktafeln. Ganzleinen Fr./DM 23.40 (1949).

BAND 5 Probleme der Naturwissenschaften. Erläutert am Begriff der Mineralart. Von *Paul Niggli*. 252 Seiten mit 100 Figuren. Ganzleinen Fr./DM 19.25 (1949).

BAND 6 Elemente der Philosophie und der Mathematik. Eine Anleitung zum inhaltlichen Denken. Von *Andreas Speiser*. 116 Seiten. Ganzleinen Fr./DM 11.45 (1952).

BAND 7 Die Maschine im Leben der Völker. Ein Überblick von der Urzeit bis zur Renaissance. Von *Franz Maria Feldhaus*. 341 Seiten mit 205 Figuren und einer Farbtafel. Ganzleinen Fr./DM 26.- (1954)

Neuerscheinungen

BAND 8 Erwachende Wissenschaft. Ägyptische, babylonische und griechische Mathematik. Von *B. L. van der Waerden*. Deutsche Übersetzung von Helga Habicht aus dem Holländischen, revidiert und mit Zusätzen des Autors versehen. ca. 484 Seiten mit 180 Figuren. Ganzleinen Fr./DM 37.50 (1956).

BAND 9 Die geistige Arbeit. Vorträge. Von *Andreas Speiser*. 207 Seiten. Ganzleinen Fr./DM 19.55 (1956).

BAND 10 Der vierdimensionale Raum. Von *R. W. Weitzenböck*. 223 Seiten mit 52 Figuren. Ganzleinen Fr./DM 19.55 (1956).

BAND 11 Symmetrie. Von *Hermann Weyl*. Übersetzung aus dem Englischen von Lulu Bechtolsheim. 160 Seiten mit 72 Figuren. Ganzleinen Fr./DM 17.70 (1956).

Verlangen Sie bitte Sonderprospekte der Sie interessierenden Werke. — Zu beziehen durch die Buchhandlungen.

Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart

Im Herbst 1956 erscheint

Fünfzig Jahre Relativitätstheorie Cinquantenaire de la Théorie de la Relativité Jubilee of Theory of Relativity

Bern, 11.–18. Juli 1955

herausgegeben von / édité par / edited by

A. Mercier und M. Kervaire

10 Hauptvorträge und 23 kurze Mitteilungen mit Diskussionen / 10 Exposés principaux et 23 Communications avec leurs discussions / 10 Main Reports and 23 Short Lectures with Discussions.

HELVETICA PHYSICA ACTA, SUPPLEMENTUM IV.

Autoren / Auteurs / Authors: A. D. Alexandrow – W. F. Baade – P. G. Bergmann – H. Bondi – M. Born – E. Corinaldesi – O. Costa de Beauregard – D. van Dantzig – V. A. Fock – Mme Y. Fourès-Bruhat – J. Géhéniau – Mrs. B. Harris-Kaufmann – O. Heckmann – F. Hoyle – L. Infeld – P. Jordan – K. Just – O. Klein – M. von Laue – A. Lichnérowicz – G. Ludwig – W. H. McCrea – C. Möller – A. Papapetrou – W. Pauli – F. A. E. Pirani – H. P. Robertson – N. Rosen – W. Scherrer – J. Tits – Mme A. Tonnelat – R. J. Trumpler – E. Wigner.

Bestellungen nimmt Ihr Buchhändler entgegen

Birkhäuser Verlag

Basel und Stuttgart

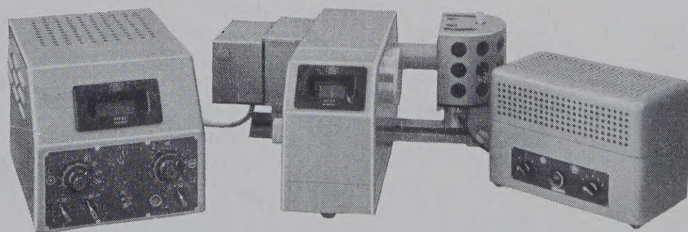
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05-657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal



Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr). Nachträgliche Erweiterung des Meßbereiches bis 2500 m μ möglich.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1 P28.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** in Vorbereitung, welche ohne Beschneidung des Spaltbildes verwendet werden können, d.h. kein zusätzlicher Lichtverlust.

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Wilcoxon and Related Tests of Significance

VAN DER VAART¹ has given exact expressions for the probability of obtaining a result in the Wilcoxon two-sample test deviating by a given amount or more from that expected, when the two samples are drawn from the same population. In his terminology, if n_1 and n_2 are the numbers in the two samples, and U_{12} is the number of pairs of individuals, in which the value observed for the member of the first sample exceeds the value observed for the second, he finds the exact probability that $U_{12} \leq u$, where u is the observed value. To do so, it is necessary to evaluate two determinants of degree u . If u is fairly large, for example 23 in one of his examples, "the calculations" he writes "may turn out to be somewhat cumbersome".

HALDANE and SMITH² have solved this problem approximately. But as their work was concerned with a question of human genetics, it seems to have escaped the notice of some statisticians. In VAN DER VAART's terminology, and choosing $n_2 \leq n_1$, their equations (10) and (11) become:

$$X = \frac{1}{2}n_2 + (u + \frac{1}{2} - \frac{1}{2}n_1n_2) [n_1(n_1 + n_2 + 1)]^{-\frac{1}{2}}$$

and

$$P(U_{12} \leq u) = \frac{X^{n_2}}{n_2!0!} - \frac{(X-1)^{n_2}}{(n_2-1)!1!} + \frac{(X-2)^{n_2}}{(n_2-2)!2!} - \dots + \frac{(-1)^r (X-r)^{n_2}}{(n_2-r)!r!},$$

where r is the greatest integer not exceeding X . This expression is not very accurate when n_2 is less than about 4, nor for very small values of P . But, as the following examples show, it is good enough for practical purposes over the range of values of P which are usually taken as critical in tests of significance. VAN DER VAART gives two numerical examples.

For $n_1 = 49$, $n_2 = 2$, $u = 7$, he finds

$$P(U_{12} \leq 7) = 0.015686.$$

Our formula gives $X = 0.17784$, $P = 0.01581$.

For $n_1 = 21$, $n_2 = 5$, $u = 23$, he finds

$$P(U_{12} \leq 23) = 0.028717.$$

Our formula gives $X = 1.2821$, $P = 0.02863$.

¹ H. R. VAN DER VAART, *Exper.* 12, 14 (1956).

² J. B. S. HALDANE and C. A. B. SMITH, *Ann. Eugen.* 14, 117 (1948).

In the first case only one term of the series was required, in the second two. The calculation takes about 5 min. We also gave methods for combining the results of several pairs of samples, for dealing with "ties", or equality between members of the two samples, and so on. VAN DER VAART's method, being exact, is perhaps preferable to ours for values of u up to 4 or 5, but I think that at higher values the simplicity of our method makes up for its slight inaccuracy.

J. B. S. HALDANE

Department of Biometry, University College, London, February 23, 1956.

Résumé

Une formule assez simple permet le calcul rapide des probabilités dans le test de WILCOXON et d'autres méthodes semblables. Sans fournir des résultats exacts, elle donne, dans les exemplaires choisis, des chiffres qui se rapprochent de la formule exacte de VAN DER VAART, avec des erreurs inférieures à 1%.

The Structure of Isothebaine

The alkaloid isothebaine, isolated by GADAMER¹ from the roots of *Papaver orientale* during the period of withering and rest of the plant, was examined in detail by KLEE², who degraded the methyl ether through a trimethoxyvinylphenanthrene to a trimethoxyphenanthrene carboxylic acid, which on decarboxylation afforded 3:4:5-trimethoxyphenanthrene (I); the work was repeated and the identity of the final product confirmed by SCHLITTLER and MÜLLER³. In view of the agreement of these independent workers the contention of KISELEV and KONOVALOVA⁴ that the end-product of the degradation is not identical with 3:4:5-trimethoxyphenanthrene may be discounted. On the basis of this degradation isothebaine methyl ether has been hitherto allotted the structure (II, $R = \text{Me}$)⁵, but attempts to

¹ J. GADAMER, *Arch. Pharm.* 249, 41 (1911).

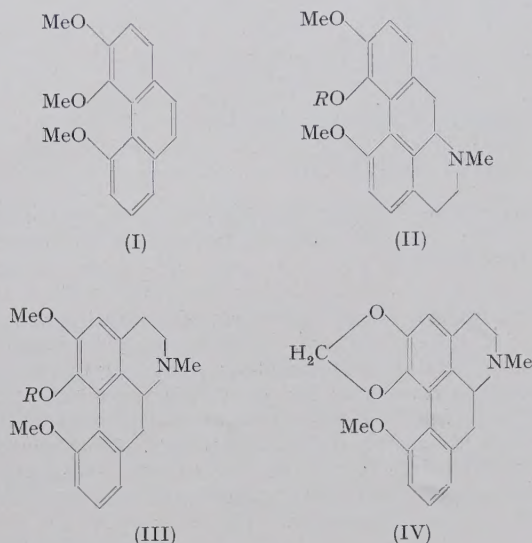
² W. KLEE, *Arch. Pharm.* 252, 211 (1914).

³ E. SCHLITTLER and J. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* 31, 1119 (1948).

⁴ V. V. KISELEV and R. A. KONOVALOVA, *J. gen. Chem. (USSR)* 19, 148 (1949).

⁵ W. KLEE, *Arch. Pharm.* 252, 211 (1914). - E. SCHLITTLER and J. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* 31, 1119 (1948).

synthesize a base of this constitution by a variety of methods have failed⁶.



What appears to have escaped notice until now, however, is that the results of degradation are equally explicable on the basis of the structure (III, $R = \text{Me}$), which we now propose for isothebaine methyl ether. That isothebaine is a 4:5:6-trioxyaporphine may be inferred from the following facts.

(a) All other naturally-occurring aporphine alkaloids, even the dioxy-bases roemerine⁷ and anonaine⁸, have oxygen substituents in positions 5 and 6 (i.e. in positions 6 and 7 of the *isoquinoline* system); in particular a base having the 4:5:6-orientation of substituents, namely pukateine (IV)⁹, is known to occur naturally.

(b) All naturally-occurring bases derived from *isoquinoline* have oxygen substituents in positions 6 and 7 of the *isoquinoline* ring, except 3 bases of the *claurine* group¹⁰, which are 7:8-disubstituted, and evidently arise by cyclisation of the *isoquinoline* ring *ortho* instead of *para* to hydroxyl. In contrast numerous bases derived from *benzylisoquinoline* are known with only one oxygen substituent in the *benzyl* group (e.g. coclaurine, artemepavine, corpaverine, tuduranine, laureline, pukateine, anolobine, stephanine, and almost all the bisbenzyl*isoquinoline* alkaloids¹⁰).

($\pm$)-4:5:6-Trimethoxyaporphine has been synthesized by GOVINDACHARI and PAI¹¹, and Professor GOVINDACHARI has been able to supply us with a few milligrams of somewhat impure hydride of this base, the infra-red spectrum of which, together with that of pure (+)-isothebaine methyl ether hydride, in Nujol, is shown in Figure 1. The fact that only a salt was available

precluded the comparison of the spectra in solution, and bearing in mind that the racemate necessarily has a crystal form different from that of the pure (+)-isomer,

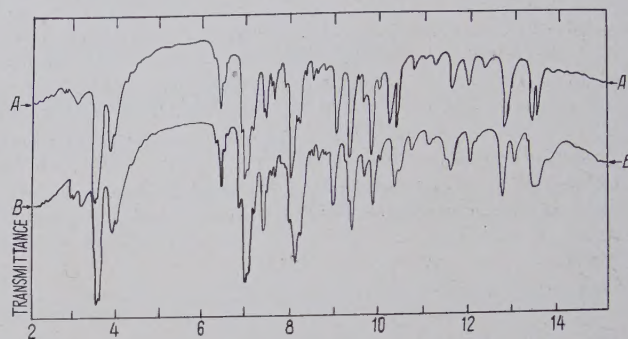


Fig. 1.—Curve A is 4:5:6-trimethoxyaporphine hydride; Curve B is isothebaine methyl ether hydride.

difference in the spectra of the two salts in Nujol mulls would be expected due to differences in distortion in the two forms of crystal. Some differences do exist between the spectra shown in Figure 1, but these are no greater

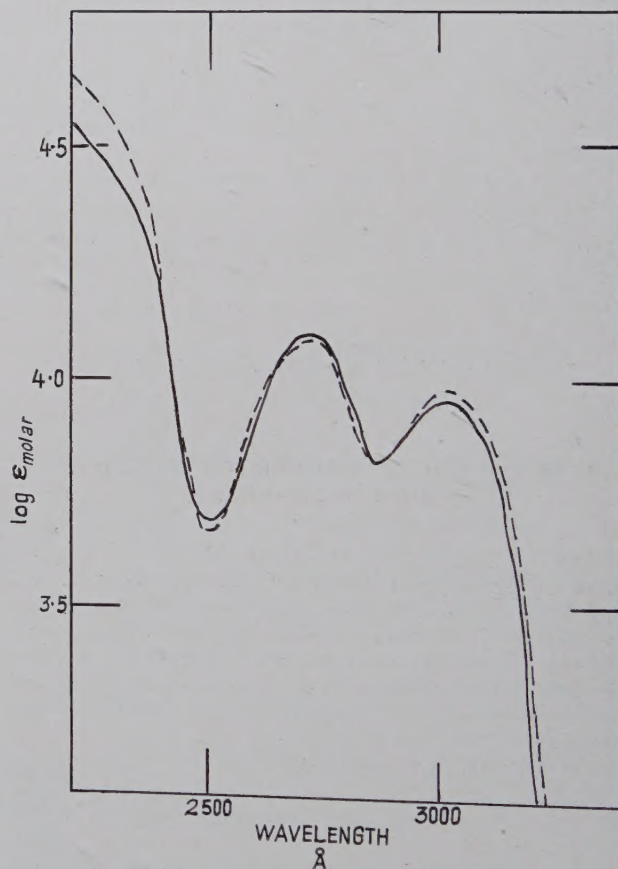


Fig. 2.— — is isothebaine methyl ether; - - - is 4:5:6-trimethoxyaporphine.

than those we have observed in the spectra of polymorphic forms of the same substance in Nujol on several occasions, and we believe that the spectra shown in Figure 1 strongly support, though do not conclusively establish the structure (III, $R = \text{Me}$) for isothebaine methyl ether. The ultra-violet spectra of the synthetic and natural materials are identical (Fig. 2).

⁶ E. SCHLITTLER and J. MÜLLER, *Helv. chim. Acta* 31, 1119 (1948). — R. K. CALLOV, J. M. GULLAND and R. D. HAWORTH, *J. chem. Soc.* 1929, 1444.

⁷ G. BARGER and G. WEITNAUER, *Helv. chim. Acta* 22, 1036 (1939). — L. MARION and V. GRASSIE, *J. Amer. chem. Soc.* 66, 1290 (1944).

⁸ G. BARGER and G. WEITNAUER, *Helv. chim. Acta* 22, 1036 (1939).

⁹ G. BARGER and E. SCHLITTLER, *Helv. chim. Acta* 15, 381 (1932).

¹⁰ R. H. F. MANSKE, *The Alkaloids*, Vol. 4 (Academic Press Inc., New York, 1954).

¹¹ T. R. GOVINDACHARI and B. R. PAI, *J. org. Chem.* 18, 1352 (1953).

Isothebaine is cryptophenolic and presumably has an *o*:*o*'-substituted phenolic nucleus, and for the alkaloid itself we propose the structure (III, $R = H$), which is strongly supported by the fact that isothebaine gives only a pale fawn colour when treated with diazotized sulphanilic acid in alkaline solution. All 4-hydroxy-bases of the aporphine and morphine groups with a vacant position 1 that we have examined couple immediately with diazotized sulphanilic acid under these conditions to give intensely red solutions, and thus the only other possible cryptophenolic structure, (II, $R = H$) can be ruled out of consideration. Indeed the structure (III, $R = H$) is the only phenolic structure based on a 4:5:6- or a 3:4:5-trioxyaporphine that has not got a free position *ortho* or *para* to hydroxyl available for coupling with diazonium salts.

In further pursuit of this problem the synthesis and resolution of 5-ethoxy-4:6-dimethoxyaporphine for comparison with (+)-isothebaine ethyl ether is now in progress.

We wish to thank Professor T. R. GOVINDACHARI for the kind gift of a sample of ($\pm$)-4:5:6-trimethoxyaporphine hydriodide, Dr. J. MÜLLER of CIBA Limited, Basle, for the very generous gift of 1.5 g of isothebaine hydrochloride, and Dr. F. B. STRAUSS and Mr. F. H. L. H. HASTINGS of the Dyson Perrins Laboratory, Oxford, for the determination of the infra-red spectra.

K. W. BENTLEY and S. F. DYKE

The Chemistry Department, The University, Aberdeen, March 10, 1956.

Zusammenfassung

Beweismaterial wird vorgelegt, das entschieden darauf hindeutet, dass Isothebain-methyläther (+)-4:5:6-Trimethoxyaporphin und Isothebain (+)-5-Oxy-4:6-dimethoxyaporphin ist.

Zur biologischen Bedeutung von Fe^{3+} und Cu^{2+} als Komplexbildner

Die Frage, in welcher Weise sich die von den Organismen aufgenommenen Metallionen auf die verschiedenen, für das biochemische Geschehen wichtigen – und in den Fermenten zum Beispiel sicher sehr spezifisch strukturierten – Chelatgruppen verteilen und wie, angesichts des stark unterschiedlichen Komplexbildungsvermögens der «biologischen» Ionen, diese Verteilung aufrechterhalten werden kann, oder aber mit welchen Änderungen in dieser Ordnung im Laufe der Zeit zu rechnen ist, ist in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Anlässlich der Tagung der Gerontologischen Gesellschaft in Basel wurde¹ auf Grund der aus der «Irving-Williams-Reihe»² für die M^{2+} abzuleitenden Gefährdung der Metallenzyme im Organismus durch die «stärksten» Ionen dieser Reihe, insbesondere durch Cu^{2+} , das Problem formuliert, ob sich Alternerscheinungen mit einer zunehmenden Besetzung von Chelatgruppen durch diese die beständig-

sten Komplexe bildenden Ionen und mit den nach solchen Austauschreaktionen besonders für die Fermentaktivität zu erwartenden Störungen in Zusammenhang bringen lassen.

Die kürzlich am Hämatologenkongress in Freiburg von RECHENBERGER³ mitgeteilte Beobachtung:

«Im Laufe des Lebens nimmt der Depoteisengehalt in den Depotorganen chemisch und histochemisch signifikant zu und erreicht in den höchsten Altersklassen bei beiden Geschlechtern sein Maximum»

veranlasst uns, über Untersuchungen zu berichten, die wir – da die angegebene «Irving-Williams-Reihe» nur die M^{2+} berücksichtigt – unternommen haben, um uns über die Konkurrenzierung von Fe^{3+} und Cu^{2+} bei der Besetzung verschiedener Chelatgruppen zu informieren.

Über das Verhältnis der Fe^{3+} - zu den Cu^{2+} -Ionen in bezug auf Stärke der Komplexbildung gegenüber verschiedenen Liganden ist bisher wenig bekannt geworden. Aus Versuchen mit Salizylsäure⁴ und Zitronensäure⁵ geht hervor, dass bei diesen Verbindungen Fe^{3+} stärker gebunden wird als Cu^{2+} . Über eine ähnliche Beobachtung mit Proteinen berichtet KLOTZ⁶.

Wir benutzten bei unseren Untersuchungen ein Austauschgleichgewicht vom Typus:



Die stöchiometrische Zusammensetzung sowohl der Chelatkomplexe als auch der in hydratisierter Form oder in Gegenwart von CH_3COO' als Azetatokomplex vorliegenden Metallionen bleibt ungewiss. Die Lage des angeführten Gleichgewichtes wurde spektrophotometrisch ermittelt unter Verwendung von geeigneten Absorptionsbanden des im System vorliegenden Cu- oder Fe-Komplexes.

Die untersuchten Systeme waren durch 0,5*m* Azetatspuffer auf $pH\ 4,15 \pm 0,05$ eingestellt und enthielten Cu^{2+} , Fe^{3+} und auch den Komplexbildner in einer Konzentration von 10^{-3} – 10^{-4} .

Es zeigte sich in unseren Versuchen, dass Glutaminsäure, Histidin und Histidyl-Histidin Cu^{2+} stärker binden als Fe^{3+} , während durch Weinsäure, *o*-Methoxyphenol, *o*-Aminophenol und Natrium-Pyrophosphat Fe^{3+} stärker als Cu^{2+} gebunden werden, das heisst, es wird entsprechend diesen Angaben durch das eine Ion das Gegenion aus dem vorgelegten Komplex verdrängt.

Diese Ergebnisse zeigen bereits, dass in bezug auf die Stabilität der Fe^{3+} - und Cu^{2+} -Komplexe eine Strukturspezifität für die verschiedenen Chelatverbindungen anzunehmen ist. Entsprechendes wird auch für die Fermentchelate gelten, so dass sowohl Cu^{2+} als aber auch Fe^{3+} die weniger stark gebundenen Metallionen verdrängen können. In welcher Weise und in welchem Umfang die Organismen dieser Gefährdung der Metallfermente begegnen können, ist zu untersuchen. Zu berücksichtigen ist, dass die Unterschiede in den Beständigkeitskonstanten der mit verschiedenen Verbindungen und mit verschiedenen Ionen aufgebauten Chelate nicht, wie man nach der Irving-Williams-Reihe vermuten

³ J. RECHENBERGER, *Europäischer Hämatologen-Kongress 1955*, Autorreferate, S. 42.

⁴ A. K. BABKO, *Zavodskaya Lab.* 13, 645 (1947); ref. in *Chem. Abstr.* 43, 3306h.

⁵ R. C. WARNER und I. WEBER, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 5086 (1953).

⁶ I. KLOTZ, *A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action* (Baltimore 1954) S. 266.

¹ S. FALLAB, *Schweiz. med. Wschr.* 85, 687 (1955).

² H. IRVING und R. J. P. WILLIAMS, *J. chem. Soc.* 1953, 3192. – Siehe auch: P. G. LÄUGER, S. FALLAB und H. ERLÉNMEYER, *Helv. chim. Acta* 37, 1050 (1954); 38, 92 (1955). – W. REGENASS, S. FALLAB und H. ERLÉNMEYER, *Helv. chim. Acta* 38, 1448 (1955).

könnte, stets die gleichen sind, sondern starke strukturspezifische Verschiedenheiten zeigen. Die Werte zum Beispiel für $K_{\text{Cu}^{2+}}/K_{\text{Fe}^{2+}}$ zeigen starke Schwankungen, so dass je nach dem Konzentrationsverhältnis der Metallionen einerseits und der Liganden andererseits auch das «schwächere» Metallion Chelate ausbilden kann. Die Beobachtung von RECHENBERGER weist jedoch darauf hin, dass im Laufe der Zeit in zunehmendem Umfange eine Anreicherung der «starken» Metallionen eintreten kann.

S. FALLAB, MARGRITH SCHUSTER
und H. ERLÉNMEYER

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel,
den 12. März 1956.

Summary

The possible role of the metabolism of heavy metal ions in the process of ageing is discussed. It is suggested that, during this process, Cu^{2+} and Fe^{3+} as strong complexing ions, inhibit the activity of other metal enzymes by replacing their metal ion-activator. The relative stability of Cu^{2+} - and Fe^{3+} -complexes with various chelating compounds related to biological systems has been determined.

A New Concept of the Alkaline Oxidation of Uric Acid¹

Scheme I shows the concept of the alkaline oxidation of uric acid (I), as based on the work of several German

¹ Communication V in the series: *Isotope experiments on the degradation of uric acid*. Communication IV see H. BRANDENBERGER, *Biochim. biophys. Acta* 18, 519 (1955). – Presented at the 128th National Meeting of the American Chemical Society, Minneapolis, Minn., September 1955.

authors², and as generally accepted prior to 1953³. The key intermediate in this series of reactions is II, the so-called BEHREND compound or hydroxy-acetylene-diureido-carboxylic acid (octahydro-6 α -hydroxy-2, 5-dioxoimidaz[d]imidazole-3 α -carboxylic acid). This intermediate was postulated by BEHREND⁴, on the basis of work of FISCHER and ACH⁵, as the only possible symmetrical compound from uric acid able to undergo transformation into the following: uroxic acid (III) by simple hydrolysis; allantoin (IV) by decarboxylation and hydrolysis with or without rearrangement (this reaction has been formulated in different ways); oxonic acid (allantoxanic acid) (V) and allantoxidine (VI) by further oxidation, deamination and decarboxylation. Cyanuric acid (VII) was thought to result mainly from III by oxidative decarboxylation and ring closure with release of NH_3 . However, it was stated that VII could also be formed from V or VI in a reaction believed to be an oxidative rearrangement⁶.

In 1953 the present author called attention to the fact that oxonic acid and allantoxidine cannot have structures V and VI, and he proposed *s*-triazine formulas for these compounds and their derivatives³. By degrading 2-, 4-, 6- and 8-labelled ^{14}C -uric acids and 7-labelled ^{15}N -uric acid, it could be shown that the uric acid carbon atoms 2, 4 and 8, and the nitrogen atoms 3 and 9 are incorporated into the ring of oxonic acid and into allantoxidine. The third nitrogen in the two degradation products is contributed 50% each from former uric acid positions 1 and 7, and the carboxyl carbon of oxonic

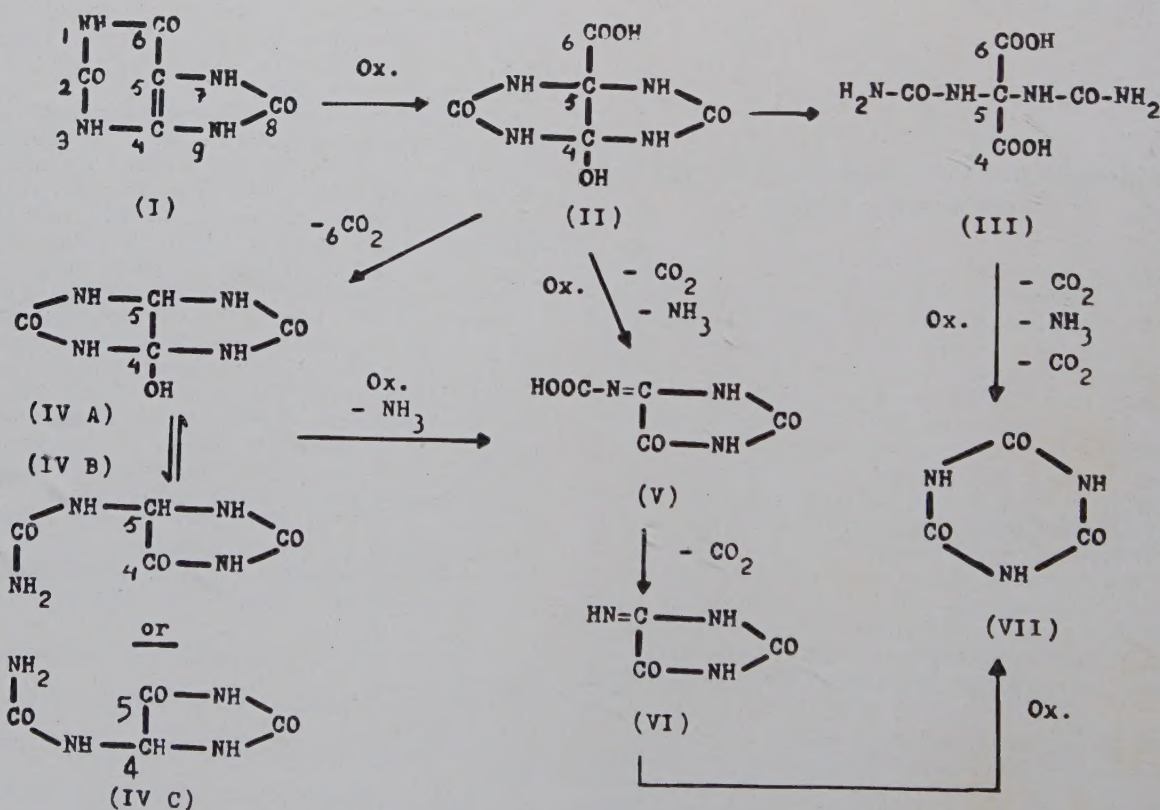
² H. BILTZ and H. SCHAUDER, *J. prakt. Chem.* 106, 108 (1923).

³ H. BRANDENBERGER, *Chimia* 7, 233 (1953); *Helv. chim. Acta* 37, 641 (1954).

⁴ R. BEHREND, *Liebigs Ann. Chem.* 333, 141 (1904).

⁵ E. FISCHER and F. ACH, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 32, 2726 (1899).

⁶ H. BILTZ and R. ROBL, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 53, 1967 (1920); 54, 2441 (1921).



Scheme I.—Old concept of the alkaline uric acid oxidation.

acid from the former uric acid position 5⁷. This tracer work could be confirmed by degradation of 5-¹⁴C-uric acid⁸, the earlier proposed structures proved by ultra-violet and infrared spectrophotometry⁹. Oxonic acid, therefore, must be formulated as 2,4-dihydroxy-6-carboxy-1,3,5-triazine (VIII), allantoxidine as 2,4-dihydroxy-1,3,5-triazine (IX).

Further, it has been shown together with R. H. BRANDENBERGER⁹ that for the formulation of allantoin alternative IV C is the correct one, because the tertiary carbon atom originates from the former uric acid position 4 and not from 5. No evidence could be found for structure IV A, with which IV B has often been thought to be in equilibrium¹⁰. Allantoic acid (X) is the real precursor of allantoin, as well as an intermediate in its oxidation to the triazines VIII and IX. This oxidation may involve hydroxy-allantoic acid (XI) and/or dehydro-allantoic acid (XII) as further intermediates⁹.

The work has also been extended to the formation of cyanuric acid (VII), which may be considered the end-product in this oxidation series. If III were its precursor, VII should contain the former uric acid carbon 5. How-

ever, by degrading the different labelled radioactive uric acids to cyanuric acid, it was possible to establish only the presence of the uric carbon atoms 2, 4 and 8 in VII¹¹. The intermediates in the oxidation to cyanuric acid are, therefore, the dihydroxy-triazines VIII and IX, and not compound III.

To the experiments already reported, a reinvestigation of the structure of uroxic acid and a study of the nature of the intermediates in the first oxidation step have now been added. They lead to a completely new conception of the mechanism of the alkaline uric acid oxidation which is summarized in Schema II. The additional facts in support of this new concept are:

(1) During the course of the oxidation and decarboxylation reactions in the alkaline degradation of radioactive labelled uric acids, the carbon atom number 4 never could be split off as CO₂.

(2) Uroxic acid is not 2,2-diureido-malonic acid (III), as has been believed so far, but is 4,5-dihydroxy-4-carboxy-5-ureido-imidazolidone-2 (XIII). This is indicated by the facts that this compound contains only one free ureido amido group (VAN SLYKE determination, as modified by G. KAINZ¹²), and that the carbon monoxide split off on heating with concentrated phosphoric acid reveals the presence of an α -hydroxy acid. The insolubility of uroxic acid in water or acid solutions agrees more with the properties of a compound having formula XIII than III.

⁷ H. BRANDENBERGER, *Helv. chim. Acta* 37, 641 (1954); *Biochim. biophys. Acta* 15, 108 (1954).

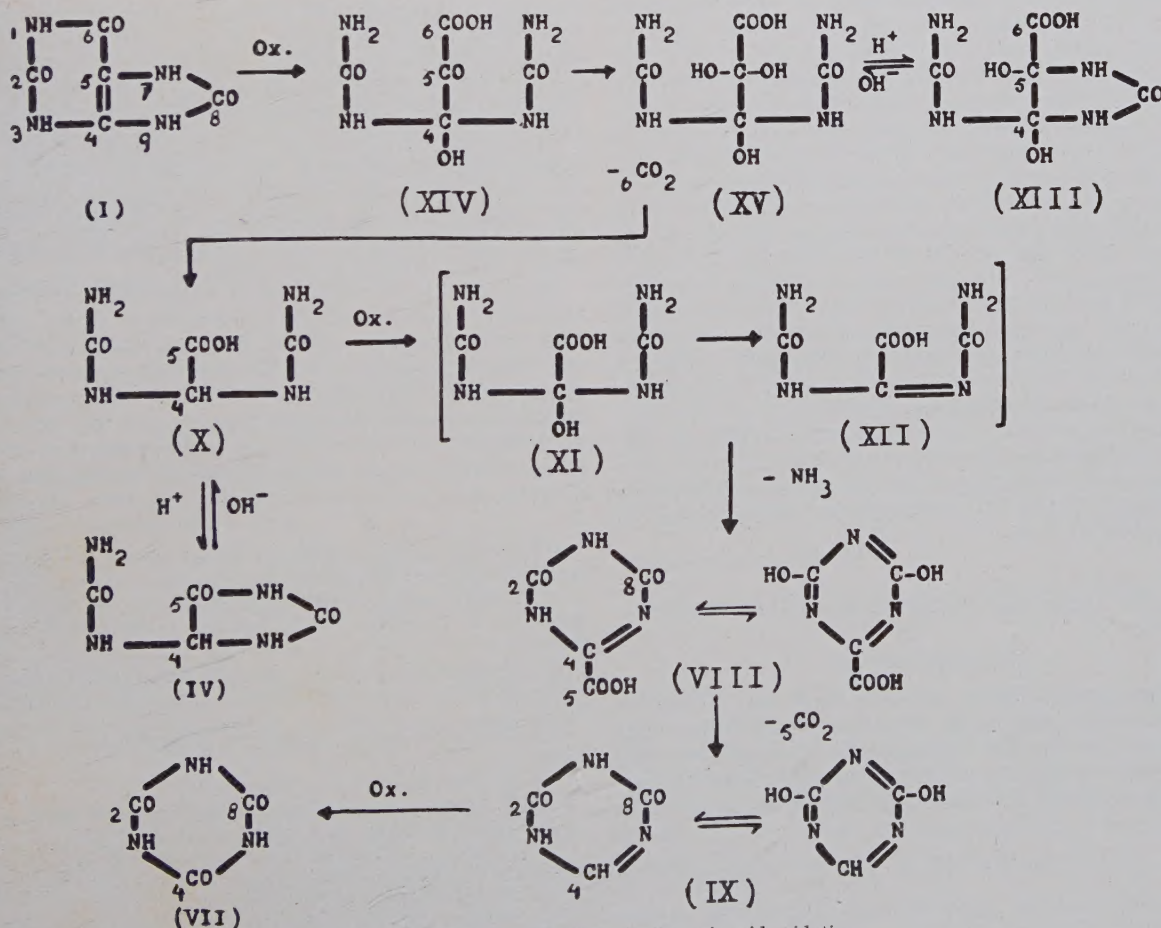
⁸ H. BRANDENBERGER and R. H. BRANDENBERGER, *Chimia* 8, 262 (1954); *Helv. chim. Acta* 37, 2207 (1954). - S. C. HARTMAN and J. FELLIG, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 1051 (1955). - E. S. CANELLAKIS and P. P. COHEN, *J. biol. Chem.* 213, 379 (1955).

⁹ H. BRANDENBERGER and R. H. BRANDENBERGER, *Chimia* 8, 262 (1954); *Helv. chim. Acta* 37, 2207 (1954).

¹⁰ W. W. HARTMAN *et al.*, *Org. Synth.*, Coll. Vol. II (1948), p. 21. - R. H. WILEY in: H. GILMAN, *Organic Chemistry*, Vol. IV (1953), p. 879.

¹¹ H. BRANDENBERGER and R. H. BRANDENBERGER, *Chimia* 8, 262 (1954).

¹² G. KAINZ, *Microchim. Acta* 1953, 349.



Schema II.—New concept of the alkaline uric acid oxidation.

(3) The imidazolidone ring of XIII is a secondary formation, occurring on acidification as in the case of allantoin. Salts, isolated from the alkaline solution after permanganate oxidation of uric acid, contain half of the total nitrogen as primary ureido amido groups. On dissolving XIII in alkaline solutions, the imidazolidone ring is cleaved, and the compound is reconverted into salts of the same open-chain product from which it has been prepared. The infrared spectra of corresponding silver salts, prepared before and after conversion to XIII, could be superimposed.

(4) During alkaline hydrogen peroxide oxidation of uric acid, the intermediary formation of a compound with an absorption maximum between 320 and 350 m μ could be followed spectrophotometrically. This compound is very unstable, and we have not been able to isolate it; but the ultraviolet maximum and the previously reported tracer experiments suggest strongly the α -keto acid formula XIV (β -diureido- β -hydroxy-pyruvic acid).

(5) Microanalytical results of the silver salts mentioned in paragraph 3 are consistent with the structure of a monohydrate of XIV, probably XV (α, α, β -trihydroxy- β -diureido-propionic acid). Analysis and properties of SCHULER and REINDEL's silver salts¹³, believed by these authors to be salts of the BEHREND intermediate II⁴, agree with structure XV as well as II. Their infrared spectra show all the bands of the silver salt spectra mentioned before; some weak additional bands in SCHULER and REINDEL's precipitate from the crude alkaline oxidation mixture of uric acid may be caused by impurities.

Of all the structures attributed in the past to the main degradation products of the alkaline uric acid oxidation (Scheme I), only two were correct, the ones for allantoin (IV) and cyanuric acid (VII). But even in these cases the mechanism of formation was not properly understood. All the other formulas had to be corrected (Scheme II). Oxonic acid and allantoxaidine are dihydroxy-*s*-triazines (VIII and IX) and are not imidazolidones (V and VI). Uroxanic acid, on the other hand, is an imidazolidone (XIII), not an open-chain compound (III). But, in our belief, the most important new fact is that the intermediates in the degradation are symmetrical open-chain compounds (XIV, XV, X) with the former uric acid position 4 as the central carbon atom. They replace the symmetrical bicyclic compound II, which has been postulated by BEHREND and considered so far to be the key intermediate not only in the alkaline chemical oxidation but also in the enzymatic degradation of uric acid. We believe, therefore, that this new concept of the chemical oxidation of uric acid (Scheme II) will also lead to a new conception of its enzymatic breakdown.

A full account of this work will be presented in *Helvetica Chimica Acta*.

H. BRANDENBERGER¹⁴

Theodor Kocher Institute, University of Bern¹⁴, January 15, 1956.

Zusammenfassung

Früher veröffentlichte Arbeiten über die alkalische Oxydation der Harnsäure wurden ergänzt durch eine Untersuchung über die Struktur von Uroxansäure sowie der Zwischenprodukte, die im alkalischen Oxydationsgemisch auftreten. Die Resultate führen zu einer grund-

legend neuen Auffassung über den Mechanismus der Abbaureaktion (Schema II). Uroxansäure ist ein Imidazolidon (XIII) und nicht ein offenkettiges Diureid (III); das von BEHREND formulierte Zwischenprodukt II hingegen, dem man bisher in der alkalisch-chemischen sowie auch in der enzymatischen Harnsäureoxydation eine Schlüsselstellung einräumte, muss durch offenkettige Verbindungen ersetzt werden (XIV, XV, X), in denen das zentrale C-Atom auf die frühere Harnsäureposition 4 zurückgeführt werden kann.

Nachweis von organspezifischen Antikörpern*

Organspezifische Antigene und Antikörper wurden schon verschiedentlich mit serologischen Methoden nachgewiesen. Früher dienten dazu hauptsächlich Präzipitation, Agglutination und Komplementbindung (HENLE und Mitarbeiter¹, FURTH und KABAT², WITEBSKY und STEINFELD³, WITEBSKY und ZEISSIG⁴, WEIL⁵, LEWIS⁶ u. a.). In letzter Zeit wurden auch radioaktiv markierte Antikörper zum erfolgreichen Nachweis der Organspezifität herangezogen (PRESSMAN⁷, BALE und Mitarbeiter⁸, u. a.). Wir berichten im folgenden kurz über eine neue Methode, mit der es gelingt, organspezifische Antigene bzw. Antikörper zu bestimmen. Mit der gleichen nephelometrischen Methode konnten wir bereits individualspezifische Gewebsantigene bzw. Antikörper erfassen (BOLLAG⁹). Das Nephelometer, das wir verwendeten, wurde von HOIGNÉ, GROSSMANN und STORCK¹⁰ zur Erfassung einer Trübungsreaktion zwischen Allergen und Serum allergischer Patienten konstruiert. Zum Nachweis von organspezifischen Antikörpern wählten wir folgendes System: Sensibilisierung von Kaninchen mittels Organen bzw. mittels eines transplantablen Tumors von Ratten. Da Rattenorgane kein Forssmann-Antigen enthalten, konnten wir Störungen durch den Forssmann-Antikörper umgehen. Um organspezifische Antikörper zu erfassen, wurden mittels des Absättigungsverfahrens die rein spezies-spezifischen Antikörper eliminiert.

Methodik. Je 3 Kaninchen wurden mit Gewebsbrei folgender Organe von Ratten sensibilisiert: Herz, Leber, Niere, transplantabler Tumor Uterusepitheliom T 8 (Guérin). Die Homogenate wurden folgendermassen hergestellt: 500 mg Leber, Herz, Niere bzw. Tumor entbluteter Ratten wurden fein zerschnitten und mit je 5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung im Potterapparat 2 min homogenisiert. Diese Organsuspension wurde den Kaninchen 2mal wöchentlich subkutan injiziert. Die Blut-

* Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

¹ W. HENLE und L. A. CHAMBERS, *Science* **92**, 313 (1940). – W. HENLE, L. A. CHAMBERS und V. GROUPE, *J. exper. Med.* **74**, 495 (1941).

² J. FURTH und E. A. KABAT, *J. exper. Med.* **74**, 247 (1941).

³ E. WITEBSKY und J. STEINFELD, *Z. Immunitätsforsch.* **58**, 271 (1928).

⁴ E. WITEBSKY und A. ZEISSIG, *Z. Immunitätsforsch.* **76**, 266 (1932).

⁵ A. J. WEIL, *Bact. Rev.* **5**, 293 (1941).

⁶ J. H. LEWIS, *J. Immunol.* **24**, 193 (1933); **41**, 397 (1941).

⁷ D. PRESSMAN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **59**, 376 (1955).

⁸ W. F. BALE, J. L. SPAR, R. L. GOODLAND und D. E. WOLFE, *University of Rochester Atomic Energy Project UR-397* (1955).

⁹ W. BOLLAG, *Exper.* **12**, 57 (1956).

¹⁰ R. HOIGNÉ, W. GROSSMANN und H. STORCK, *Schweiz. med. Wschr.* **85**, 578 (1955).

¹³ W. SCHULER und W. REINDEL, *Z. physiol. Chem.* **208**, 248 (1932).

¹⁴ Present address: Nestlé Research Laboratories, Vevey, Switzerland.

entnahmen erfolgten aus den Ohrvenen. Die Technik der Herstellung der wasserklaren Antigenlösung und die nephelometrische Methodik der Reaktion dieser Antigenlösungen mit dem im Serum zirkulierenden Antikörpern ist dieselbe wie bereits früher beschrieben (BOLLAG⁹).

Die Seren sämtlicher Kaninchen wurden auf ihre Reaktion mit Herz, Leber, Niere und Tumor von Ratten untersucht. Mit allen Organantigenlösungen wurden Titerbestimmungen durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Absättigung des Serums mit sämtlichen Organextrakten, worauf erneute Titerbestimmungen gegen alle Antigene vorgenommen wurden. Die Absättigung erfolgte derart, dass man 1 Teil Serum mit 4 Teilen Antigen während 1 h bei Zimmertemperatur stehen liess. Das Serum der gegen Rattenorgane sensibilisierten Kaninchen wurde auch auf seine Reaktion gegenüber Herz-, Leber- und Nierenantigenen von Mäusen und Meerschweinchen geprüft.

Tabelle I

Sensibilisierung mit:	Trübungsreaktion mit:			
	Herz	Leber	Niere	Tumor
Herz	1:16	1:4	1:4	neg.
Leber	1:4	7:8	1:4	neg.
Niere	1:4	1:4	7:8	neg.
Tumor	1:8	1:8	1:8	1:16

Antikörpertiter im Serum von Kaninchen, die mit Rattenorganen sensibilisiert wurden.

Resultate. 3–4 Wochen nach Beginn der Sensibilisierung wurde die Trübungsreaktion zwischen Serum und Organantigen positiv. Die Reaktion mit dem Antigen des zur Sensibilisierung verwendeten Organs wurde jeweils zuerst positiv und blieb auch am längsten positiv. Zur Zeit des höchsten Titeranstieges konnten Antikörper meist auch gegen alle nicht zur Sensibilisierung gebrauchten Organe nachgewiesen werden. Die höchsten Titer wurden immer mit demjenigen Organantigen erreicht, mit dem das Kaninchen sensibilisiert wurde. In der Tabelle I sind 4 Beispiele angegeben.

Tabelle II. Sensibilisierung mit Tumor

	Trübungsreaktion mit:			
	Tumor	Herz	Leber	Niere
Vor Absättigung	1:16	1:8	1:8	1:8
Nach Absättigung mit:				
Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.
Herz	1:4	neg.	neg.	neg.
Leber	1:4	neg.	neg.	neg.
Niere	1:4	neg.	neg.	neg.

Antikörpertiter im Serum eines Kaninchens, das mit einem Rattentumor, dem transplantablen Uterus-Epitheliom T8, sensibilisiert wurde. Vor und nach Absättigung des Serums mit verschiedenen Rattenorganantigenen.

Aus der Tabelle geht deutlich hervor, dass speziesspezifische Antikörper vorhanden sind, die mit allen Rattenorganen reagieren. Eine merkwürdige Ausnahme bildete das Tumorentigen, das nicht mit Anti-Herz-, Anti-Leber- oder Anti-Nieren-Seren reagierte. Die hohen Titer, die mit dem zur Sensibilisierung verwendeten

Tabelle III. Sensibilisierung mit Herz

	Trübungsreaktion mit:		
	Herz	Leber	Niere
Vor Absättigung	1:16	1:4	1:4
Nach Absättigung mit:			
Herz	neg.	neg.	neg.
Leber	1:4	neg.	neg.
Niere	1:4	neg.	neg.

Antikörpertiter im Serum eines Kaninchens, das mit Rattenherz sensibilisiert wurde. Vor und nach Absättigung des Serums mit verschiedenen Rattenorganantigenen.

Organ erreicht wurden, liessen zusätzliche organspezifische Antikörper vermuten. Die Resultate nach Absättigung der Seren mit den verschiedenen Organantigenen erlaubten die Feststellung, dass neben rein speziesspezifischen noch organspezifische Antikörper vorhanden waren. In Tabelle II und III sind 2 solche Beispiele angegeben.

Nach Absättigung mit dem sensibilisierenden Organ werden alle Reaktionen negativ, da sowohl speziesspezifische wie organspezifische Antikörper absorbiert werden. Nach Absättigung mit einem nicht zur Sensibilisierung verwendeten Organ bleibt einzig die Trübungsreaktion mit dem Antigen des sensibilisierenden Organs positiv. Dies war regelmässig bei Herz, Leber, Niere und Tumor zu beobachten. Diese nachgewiesenen organspezifischen Antikörper scheinen sehr spezifisch zu sein, da sie untereinander – wenigstens bei den von uns untersuchten Organen und dem Tumor – keine gekreuzten Reaktionen ergeben. Um die Frage abzuklären, ob die mit unserer Methode nachgewiesenen organspezifischen Antikörper speziesspezifisch oder speziesspezifisch sind, wurden die Seren der mit Rattenorganen sensibilisierten Kaninchen auch auf ihre Reaktion mit den entsprechenden Organantigenen von Mäusen und Meerschweinchen geprüft. Die organspezifischen Antikörper reagierten in keinem Falle mit den Organen dieser verwandten Nagetiere. Die organspezifischen Antikörper sind nach unseren bisherigen Untersuchungen artgebunden. Es handelt sich um eine organspezifische Komponente eines speziesspezifischen Antikörpers.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der von uns angewandten Methode in den beschriebenen Experimenten einerseits reine speziesspezifische Antikörper und andererseits organspezifische, jedoch speziesspezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten.

W. BOLLAG

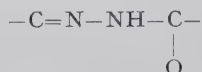
Medizinische Universitätsklinik Zürich, 20. März 1956.

Summary

Using a new nephelometric method, species-specific and organ-specific antibodies have been demonstrated. By means of the absorption technic organ-specific components of species-specific antibodies of high specificity have been determined in the serum of rabbits sensitized with various rat organs (heart, liver, kidney, tumor).

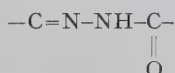
Activité tuberculostatique de certaines pyridazones

Au cours de nos recherches sur l'activité antituberculeuse des dérivés de la phtalazine, nous avons observé que la présence de l'enchaînement moléculaire

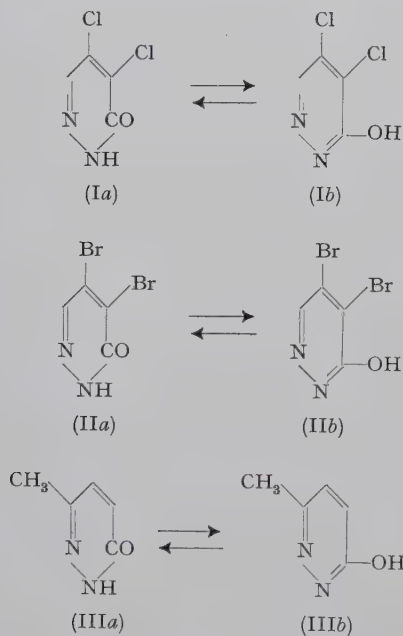


fait apparaître souvent une activité tuberculostatique notable¹. Ces recherches ont été reprises par OFFE, SIEFKEN et DOMAGK, et ont servi de fil conducteur à ces auteurs pour leur découverte de l'activité de l'isonicotinylhydrazine², découverte à laquelle parvinrent à la même époque FOX, GRÜNBERG et SCHNITZER³, qui, eux, étaient partis de l'étude des amides et thiosemicarbazones de la série pyridinique.

Il nous a semblé intéressant de déterminer l'activité tuberculostatique de quelques pyridazones, qui possèdent également dans leurs molécules l'enchaînement



précité. Trois composés de cette série ont ainsi été étudiés: la 4,5-dichloro-3-pyridazone (Ia), la 4,5-dibromo-3-pyridazone (IIa), et la 6-méthyl-3-pyridazone (IIIa); ces corps peuvent également être représentés par les formules tautomères (Ib), (IIb) et (IIIb).



Les composés (I) et (II) ont été préparés en faisant réagir l'hydrate d'hydrazine sur les acides mucobro-

mique et mucochlorique en milieu acétique, et le composé (III) a été synthétisé d'après la littérature⁴. L'activité bactériostatique a été déterminée *in vitro* sur *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (souche H 37 Rv), poussant sur milieu de Dubos-Davis, la progression de la pousse bactérienne étant suivie par opacimétrie différentielle au moyen d'un électrophotomètre. Les résultats, indiqués par les courbes de croissance de la Figure 1 (les ordonnées de ces courbes correspondent aux graduations en microampères de l'électrophotomètre), montrent qu'à la concentration de 10^{-4} , la 4,5-dibromo-3-pyridazone inhibe totalement la croissance bactérienne (à la concentration de 10^{-5} il y a un effet inhibiteur partiel), la 4,5-dichloro-3-pyridazone étant légèrement moins active, et la 6-méthyl-3-pyridazone ne produisant qu'un faible retard de croissance. Avec ce dernier corps, une inhibition complète n'a pu être réalisée qu'à une concentration de 10^{-3} ; OFFE, SIEFKEN et DOMAGK, travaillant avec des souches et un milieu de culture différents, avaient noté une inhibition complète dès la concentration de 10^{-6} .

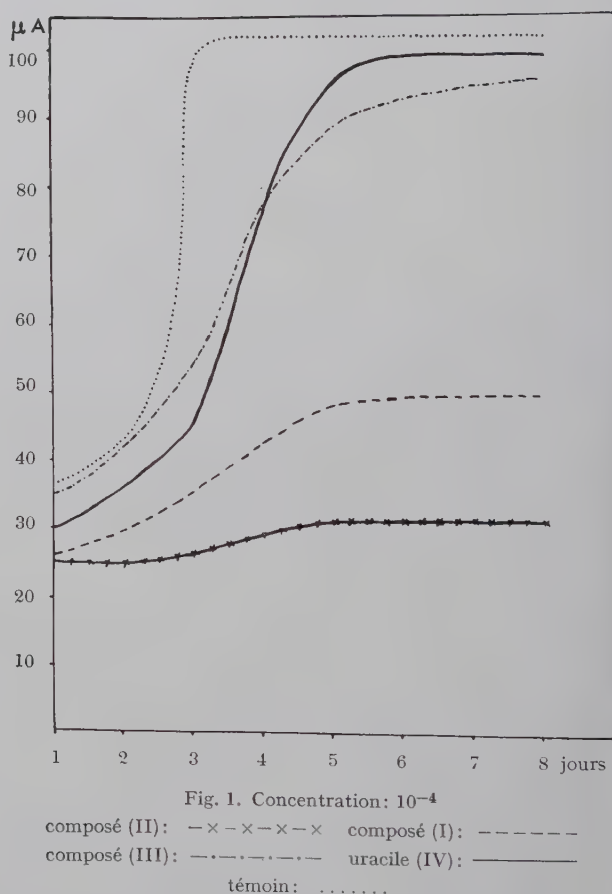
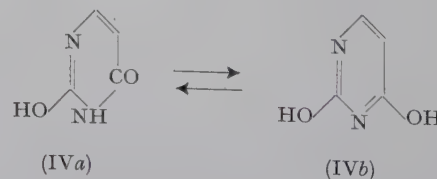


Fig. 1. Concentration: 10^{-4}

La structure chimique des pyridazones étudiées se rapprochant de celle de l'uracile (IV), qui est un facteur



¹ J. P. JOUIN et N. P. BUU-HOÏ, Ann. Inst. Pasteur 72, 589 (1946). — N. P. BUU-HOÏ, G. DECHAMPS, N. HOAN, H. LE BIHAN, A. R. RATSIMAMANGA et F. BINON, C. r. Acad. Sci. 228, 2037 (1949); Arch. int. Pharmacodyn. Thérap. 91, 52 (1952). — N. P. BUU-HOÏ, H. LE BIHAN et F. BINON, Rec. Trav. chim. 70, 1099 (1951).

² H. A. OFFE, W. SIEFKEN et G. DOMAGK, Z. Naturf. 7(b), 446, 462 (1952).

³ H. A. FOX, Science 116, 129 (1952). — F. GRÜNBERG et R. J. SCHNITZER, Quart. Bull. Sea View Hospital 13, 3 (1952).

⁴ O. POPPENBERG, Ber. dtsch. chem. Ges. 34, 3257 (1901).

de croissance pour certaines bactéries, il était intéressant de rechercher si la bactériostase due aux pyridazines étudiées pourrait être inhibée par addition d'uracile au milieu de culture; l'expérience montre qu'il n'en est rien (Fig. 2), et que l'uracile ne semble pas se comporter comme un stimulant de la croissance du bacille tuberculeux (Fig. 1).

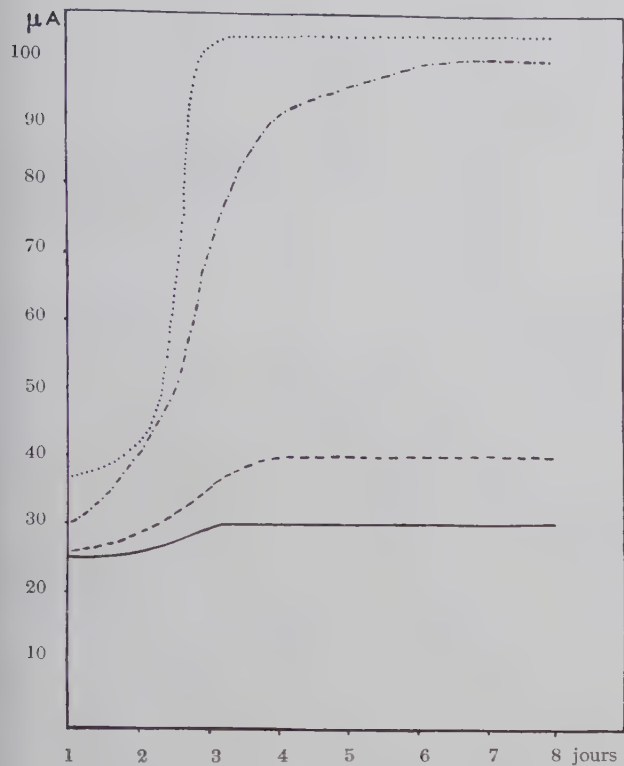


Fig. 2. Concentrations de 10^{-4} pour l'uracile comme pour les composés (I), (II) et (III)

composé (II) + uracile: ————— composé (I) + uracile: ————
composé (III) + uracile: -.-.-.-.- témoin:

En résumé, il a été montré que certaines pyridazones substituées possèdent une activité tuberculostatique *in vitro*, qui n'est pas inhibée par l'uracile; ce dernier corps n'apparaît pas comme étant un facteur stimulant de la croissance du bacille tuberculeux.

Nous remercions M^{lle} L. SCHEMBRI pour l'aide qu'elle nous a apportée dans ces recherches.

N. P. BUU-HOÏ, R. RIPS et R. ROYER

Institut du Radium de l'Université de Paris, Département de Chimie organique, le 2 février 1956.

Summary

4,5-Dibromo-3-pyridazone is shown to have notable *in vitro* tuberculostatic activity; 4,5-dichloro-3-pyridazone is somewhat less active, and 6-methyl-3-pyridazone considerably less so. This effect is not reversed by aracil, which does not act as a growth-stimulant for tubercle bacilli.

Schutzwirkung von polysaccharidartigen Fraktionen bakterieller Herkunft bei einer experimentellen Virusinfektion

GINSBERG und HORSFALL und Mitarbeiter¹ haben gezeigt, dass mit Kapselsubstanz von Friedländerbazillen eine therapeutische Wirkung bei der Infektion der Maus mit PVM-Virus, oder des Hühnerembryos mit Mumpsvirus erzielt werden kann. Eigene Untersuchungen haben ergeben, dass Polysaccharide von anderen Bakterien eine Reihe von Wirkungen auf mesenchymale Reaktionen haben², und dass einzelne eine Schutzwirkung bei bakterieller Infektion besitzen³. Untersuchungen des einen von uns ergaben⁴, dass natürliche virushemmende Serumfaktoren durch *in vitro* virushemmende hochpolymere Verbindungen meist in hemmendem Sinne beeinflusst werden können. Weiter wurde von PILLEMER⁵ gezeigt, dass verschiedenartige Polysaccharide mit dem Properdinfaktor des Serums reagieren können und dadurch in vorläufig nicht übersehbarer Weise einen Einfluss auf Infektionsschutzsysteme gewinnen können. Polysaccharide und andere Polymere üben offenbar einen Einfluss auf Infektionsprozesse im Tier nur aus, wenn ganz bestimmte Bedingungen erfüllt sind. Es ist für die Erkenntnis des Spezifitätsgrades dieser Wirkung von besonderem Interesse, dass es uns möglich war, bei einer bestimmten Virusinfektion mit einer gewissen Bakterienpolysaccharidfraktion einen ausgesprochenen Schutzeffekt zu erzielen. Es handelt sich um die Wirkung einer Polysaccharidfraktion bei der Col.SK.-Encephalomyelitis an Mäusen. Die von uns verwendeten polysaccharidartigen Fraktionen aus Bakterien wurden von F. W. KAHNT in den chemischen Laboratorien der Pharma-wissenschaftlichen Abteilung hergestellt.

1. *Schutzwirkung in Mäusen gegen Col.SK.-Encephalomyelitis-Virus.* Weisse MM-Mäuse von 15 g Gewicht wurden intraperitoneal mit abgestuften Infektionsdosen infiziert. Zur Infektion diente Hirnmaterial von Passagemäusen, die typische Paralysen aufgewiesen hatten. Je nach Höhe der Infektionsdosis zeigten die erkrankten Mäuse frühestens am 4. Tag Lähmungen der Hinterextremitäten; der Exitus erfolgte in der Regel spätestens bis zum 8. Tag. Die zu prüfende Substanz wurde einmal 48 h vor der Infektion intravenös in der Dosis von 5 mg/kg injiziert.

Tabelle I

Einfluss der Behandlung mit hochmolekularer Fraktion A aus gram-negativen Bakterien auf die Sterberate virusinfizierter Mäuse

Behandlung der Mäuse	Infektionsdosis, LD ₅₀			
	1000	100	10	1
Unbehandelt	gestorb. Mäuse 22/24	gestorb. Mäuse 31/33	infiz. Mäuse 26/33	infiz. Mäuse 12/24
Fraktion A 1 × 5 mg/kg intraven, 48 h vor Infektion	21/24	16/29	8/30	5/23

¹ H. S. GINSBERG und F. L. HORSFALL, J. exper. Med. 87, 385 (1948); 93, 161 (1951). — F. L. HORSFALL und M. McCARTY, J. exper. Med. 85, 623 (1947).

² R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953); 10, 376 (1954). – R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exp. Path. Pharm. 224, 104 (1955).

³ R. MEIER und L. NEIPP, Schweiz. med. Wschr. (im Druck).

⁴ F. KRADOLFER, Schweiz. Z. Path. Bakt. 18, 1112 (1955).

⁵ L. PILLEMER, L. BLUM, J. H. LEPOW, O. A. ROSS, E. W. TODD und A. C. WARDLAW, *Science* **120**, 279 (1954). — L. PILLEMER, M. D. SCHOENBERG, L. BLUM und L. WIRZ, *Science* **122**, 545 (1955).

Die in Tabelle I zusammengefassten Daten von 10 gleichartig durchgeführten Versuchen lassen den Schluss zu, dass noch mit 100 Infektionsdosen (LD_{50}) infizierte Mäuse signifikant geschützt werden können (Beobachtungsdauer 12 Tage). Irrtumswahrscheinlichkeit $P = < 0,1\%$ bei 10 LD_{50} und bei 100 LD_{50} . In ergänzenden Versuchen hatte sich ergeben, dass der optimale Effekt einer einmaligen Polysaccharidinjektion abhängig ist vom Behandlungstermin.

2. *Beeinflussung von Virus und Serumfaktoren in vitro.* Zur Abklärung des Wirkungsmechanismus wurde die Wirkung gegenüber Virus *in vitro* untersucht. Die erwähnte polysaccharidartige Fraktion und mehrere andere, durch chemische Behandlung aus Bakterien erhaltene Stoffe vermögen die Virushämagglutination von Influenzavirus nicht zu hemmen. Dies im Gegensatz zu gewissen Mucopolysacchariden und zu den Polysacchariden von GINSBERG⁶ oder MACPHERSON *et al.*⁷. Im Brutei wurde gegen Influenzavirus A keine Hemmwirkung festgestellt. Bei Mischung mit Serum *in vitro* wird die virushemmende Wirkung des Serums herabgesetzt.

Frisches Meerschweinchen Serum wurde mit verschiedenen Polysacchariden vermischt und 1 h lang bei 6°C stehengelassen. Das so behandelte Serum wurde zu Krebs-Ringer-Glukose-Medium gegeben (Serum-Endkonzentration 1:30) und mit je 2 etwa 25 mm² grossen Stückchen von Chorioallantoismembranen 14tägiger Hühnerembryonen beschickt. Je 12 derartige Proben wurden sodann abgestuft mit Influenzavirus PR₈ beimpft und für 24 h bei 37°C bebrütet. Danach wurde die Virusentwicklung mittels der Hämagglutination von Hühnererythrozyten festgestellt. In entsprechenden Kontrollen wurde gesichert, dass die zugesetzten Serumproben die Virushämagglutination nicht hemmten. Während der Infektionstiter des verwendeten Influenzavirus ohne Serumzusatz bei dieser Prüfung 10^{-6} betrug, reduzierte der Serumzusatz den Virustiter regelmässig auf 10^{-3} bis $10^{-2,5}$.

Tabelle II

Einfluss verschiedener Bakterienprodukte auf die Virusentwicklung in Gegenwart von Serum

Serum gemischt mit	Infektionstiter in Gegenwart der Serumproben (10 g)
Ohne Serum/ohne Po . . .	6
Serum ohne Po	2,5
+ Präp. C 1:1000*	4,5
+ Präp. B 1:1000	4,0
+ Präp. A 1:1000	4,0

* Die genauen Formeln werden anderswo publiziert.

Die virushemmende Wirkung des Meerschweinchen-Serums wird durch Mischung mit Bakterien-substanzen in einer Konzentration von 10^{-3} um das 30- bis 100fache herabgesetzt. Dabei ist ein schwerlösliches Produkt aus Bakterienrückständen (Präparat C) am stärksten wirksam, während die beiden anderen Präparate (A und B), die aus der von Bakterien abgetrennten Kulturflüssigkeit stammen, etwas weniger stark inaktivieren.

⁶ H. S. GINSBERG, W. F. GOEBEL und F. L. HORSFALL, J. exper. Med. 87, 411 (1948).

⁷ J. A. MACPHERSON, J. F. WILKINSON und R. H. A. SWAIN, Brit. J. exper. Path. 34, 603 (1953).

Die Bestimmung der virushemmenden Wirkung des Serums nach Applikation von Präparat A bei der Ratte ergibt zwei Phasen. Die virushemmenden Werte sind zunächst während einer Periode von 24 bis 96 h erniedrigt, später steigt die virushemmende Aktivität des Serums wieder an. Abfall und Anstieg der Viruzidiwerte der Seren decken sich zeitlich nicht mit den Veränderungen der Komplementaktivität in den gleichen Seren, unter Berücksichtigung der von PILLEMER zur Bestimmung des Properdins angegebenen Methode.

Aus den vorstehenden Befunden ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. dass eine Vorbehandlung mit der untersuchten Polysaccharidfraktion bei einer bestimmten Virusinfektion einen Infektionsschutz hervorbringen kann;
2. dass *in vitro* keine direkten virushemmenden Eigenschaften dieser polysaccharidartigen Fraktion nachzuweisen sind;
3. dass eine Änderung des viruziden Verhaltens der Seren durch die angewandten Bakterienprodukte hervorgerufen wird.

Das Ergebnis zeigt, dass die Wirkung der vorliegenden Substanzen sich von derjenigen der von GINSBERG untersuchten Stoffe unterscheidet und dass der Wirkungscharakter nicht dem des von PILLEMER beschriebenen Faktors entspricht. Obschon die Wirkung wahrscheinlich auf der Beeinflussung «normaler Abwehrfunktionen» beruht, besteht ausserdem ein hoher Spezifitätsgrad insofern, als offenbar nur ganz bestimmte polysaccharidartige Fraktionen wirksam sind und die Beeinflussung der Virusinfektion von speziellen Konditionen hinsichtlich Virusstamm und Mausmaterial abhängig ist.

R. MEIER und F. KRADOLFER

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, den 1. März 1956.

Summary

A polysaccharide like substance derived from cultivated bacteria is shown to exert a protective effect in mice infected with SK.-Col. Encephalomyelitis. The effect is optimally produced when the substance is applied previous to the infection. Certain changes in sera treated with the substance are observed involving normal virucidal factors of the sera.

L'azione protettiva dell'acido tioctico nell'intossicazione da cianuro di potassio

Le ricerche compiute in questi ultimi tempi da uno di noi (CUTOLO¹) sull'enzima rodanese e sulla costituzione chimica della sua parte coenzimatica, hanno messo in luce la possibilità che tale coenzima contenga acido tioctico.

Allo scopo di avere un dato sperimentale che confermasse tale possibilità, abbiamo voluto vedere se l'acido

¹ E. CUTOLO, non pubbl.

tiotico e l'acido tiotico ridotto, esercitassero un'azione protettiva nell'intossicazione da cianuro di potassio, qualora fossero somministrati preventivamente. D'altro canto se l'effetto protettore dell'acido tiotico era dovuto principalmente alla presenza di gruppi tiolici o disolfuri nella sua molecola, anche altre sostanze contenenti tali gruppi dovevano presentare la medesima attività: per tale ragione abbiamo sperimentato parallelamente come protettori la cisteina, il BAL (dimercaptopropanolo), la pantetina (bis-N-pantotenilamidoetil-disolfuro) ed il tiosolfato sodico.

Può essere inoltre interessante rammentare che in alcuni altri tipi di intossicazione l'acido tiotico si è dimostrato più attivo del BAL².

Per questi esperimenti sono stati utilizzati topolini di sesso maschile, di peso compreso tra 20 e 25 g, provenienti dal nostro allevamento, ed in ottime condizioni generali.

Gli animali sono stati suddivisi in 7 gruppi di 20 ciascuno: il primo gruppo riceveva solo KCN (15 mg/kg) per via sottocutanea, agli altri 6 gruppi il KCN veniva somministrato per la stessa via ed alla stessa dose, 10 min dopo l'iniezione della sostanza protettiva.

Il secondo gruppo era protetto con acido tiotico (AT), contenente il legame disolfuro, che veniva somministrato alla dose di 46 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,23%, allestita al momento dell'uso).

Il terzo gruppo era protetto con acido tiotico ridotto (ATH), contenente cioè 2 gruppi -SH, che veniva somministrato alla dose di 48 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,24% allestita al momento dell'uso).

Il quarto gruppo era protetto con cisteina (CIST) che veniva somministrata alla dose di 76 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,38% allestita al momento dell'uso).

Il quinto gruppo era protetto con BAL che veniva somministrato alla dose di 28 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione acquosa allo 0,14% allestita al momento dell'uso).

Il sesto gruppo era protetto con pantetina (PANT) che veniva somministrata alla dose di 124 mg/kg per via endoperitoneale (soluzione allo 0,62% allestita al momento dell'uso).

Il settimo gruppo era protetto con il tiosolfato sodico (TIOS) alla dose di 114 mg/kg (soluzione allo 0,57% preparata al momento dell'uso).

Le dosi di AT, ATH, BAL, PANT erano equimolecolari con quella di KCN, quelle di CIST e TIOS erano due volte molecolari.

In esperimenti antecedenti ci eravamo assicurati che per nessuna sostanza le dosi impiegate fossero tossiche o in qualche modo dannose per gli animali.

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella.

Per calcolare le percentuali di mortalità, l'errore standard σ_M e t ci siamo serviti dei metodi consigliati da GÜNTHER³ e la probabilità P è stata ricavata dalle tabelle di FISHER e YATES⁴.

I valori di t e P sono stati calcolati rispetto agli animali del primo gruppo.

Dai risultati esposti in Tabella e dalla analisi statistica effettuata, appare chiara l'azione protettiva esercitata dall'acido tiotico in verità assai più spiccata per l'ATH.

D'altro canto i risultati ottenuti con il BAL non si discostano da quelli osservati per l'acido tiotico.

Per la cisteina e per il tiosolfato i risultati sono indubbiamente meno probativi e con questi prodotti ci troviamo al limite della significatività.

Ani- mali N°	KCN mg/kg sotto- cute	Sostanza pro- tettiva e dose mg/kg endo- peritoneo	Mortalità			
			N° animali morti	% $\pm \sigma_M$	t	P
20	15	—	17	82 $\pm$ 8	—	—
20	15	AT-46	9	45 $\pm$ 10	2,8	0,01– 0,001
20	15	ATH-48	3	18 $\pm$ 8	5,6	<0,001
20	15	CIST-76	12	59 $\pm$ 10	1,77	0,1– 0,05
20	15	BAL-28	8	41 $\pm$ 10	3,15	0,01– 0,001
20	15	PANT-124	15	73 $\pm$ 9	1,09	0,3– 0,2
20	15	TIOS-114	11	54 $\pm$ 10	2,08	0,05– 0,02

Quasi del tutto negativi infine i risultati osservati con la pantetina.

L'insieme dei dati esposti parrebbe quindi confermare che l'azione protettiva dell'acido tiotico nella intossicazione acuta da KCN è dovuta solo in parte alla presenza nella sua molecola di gruppi tiolici, ma più probabilmente ad un suo intervento come sostanza coenzimatica.

E. CUTOLO e F. REDUZZI

Laboratorio Ricerche dell'Istituto Sieroterapico Italiano,
Napoli, 12 dicembre 1955.

Summary

The protective action of thioctic acid and of its reduced form in acute potassium cyanide poisoning has been studied in comparison with the antitoxic action of other compounds with mercapto or disulfide groups.

The results permit the following conclusions: (1) Maximum protective action is given by reduced thioctic acid; (2) thioctic acid and BAL have almost the same activity; (3) cysteine and sodium thiosulfate have a protective activity of a much lower order; (4) panthethine is almost inactive. The authors offer the hypothesis that the greater activity of thioctic acid is due to its possible presence as coenzyme in rhodanese.

The Role of pH in Nitrogen Utilization
by *Piricularia oryzae*

In preliminary studies on the physiology of *Piricularia oryzae*, the fungus causing the blast disease of rice, it was found that the isolate used failed to utilize the usual in-

² F. REDUZZI, Boll. Soc. Ital. Biol. speriment. 31, 615 (1955). – P. BONI, F. REDUZZI, G. BILE e V. GALLORO, Clin. Terap. 9, 129 (1955). – L. DONATELLI, Relazione al Simposio Intern. sull'Acido Tiotico, Napoli 28–29 nov. 1955 – Atti (in corso di stampa).
³ G. POUMEAUX-DELILLE, Techniques biologiques en endocrinologie expérimentale chez le rat (Masson, Paris 1953), p. 161.
⁴ R. A. FISHER e F. YATES, Statistical Tables (Oliver and Boyd, London 1948), p. 32.

organic ammonium nitrogen sources such as ammonium chloride, ammonium sulphate and ammonium nitrate, whereas it readily utilized other nitrate sources, supplied as the sole source of nitrogen in Richard's medium. When mixtures of potassium nitrate and ammonium sulphate in varying percentages (keeping the total nitrogen levels constant) were supplied, the growth of the fungus was inhibited when the ammonium nitrogen exceeded 10% of the total nitrogen in the medium. However, the addition of organic acids (fumaric, succinic, tartaric, citric, oxalic, acetic and lactic acids at 0.5% levels) readily aided the utilization of inorganic ammonium nitrogen. Such stimulatory action of organic acids of the Krebs cycle in the utilization of inorganic ammonium has been recorded by many workers¹ and two explanations have been offered for such stimulation. While MACHLIS² has stressed the importance of pH, BRIAN *et al.*³, working with *Metarrhizium glutinosum*, do not consider pH to be the causal factor; the organic acids are supposed to aid the formation of α -keto acids of the Krebs cycle which interact with the inorganic ammonium in the synthesis of aspartic and glutamic acids. Hence, more intensive work aimed at elucidating the factors responsible for such stimulation was undertaken.

From a study of the final pH of the medium after 18 days' incubation it was seen (Table) that it fell to 2.8 in the unsupplemented ammonium sulphate medium, whereas it remained steady at 4.0 with the nitrate source. It is probable that the steep fall in the final pH of the ammonium medium (far below the optimum range) to as low a level as 2.8 might be responsible for the very poor growth. It was therefore considered worthwhile investigating whether a proper control of pH during growth might aid the utilization of ammonium nitrogen. Poorly ionized inorganic ammonium nitrogen sources, ammonium carbonate and ammonium phosphate $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, which have strong buffering action, were therefore supplied as sole source of nitrogen. The results, as can be seen from the Table, clearly indicate that the fungus could make normal growth with these sources of nitrogen. It is interesting to observe that the final pH of the medium with these two sources of nitrogen and also with nitrate-ammonium mixtures, where the ammonium nitrogen did not exceed 10% of the total, are in the range of 3.6 to 4.0. The incorporation of an acid neutralizer such as calcium carbonate (separately sterilized and added to the medium to avoid adsorption) at the rate of 0.4% in the ammonium sulphate medium resulted in normal growth of the fungus accompanied by a final pH of 6.3. It is therefore evident from the results that the pH of the medium during growth is a vital factor controlling the utilization of strongly ionized inorganic ammonium nitrogen.

It is probable that an efficient control of the pH of the medium during growth might result in the initial synthesis of four carbon dicarboxylic acids which as indicated by BRIAN *et al.*³ might favourably influence the formation of the Krebs intermediaries for the synthesis

of aspartic and glutamic acids. While nothing conclusive is known of the *modus operandi* of organic acids in stimulating growth and aiding utilization of inorganic ammonia, it is not presumptuous to postulate that they might act as buffering agents controlling the pH of the

Nitrogen sources	Mat weight in mg	Final pH
1. Potassium nitrate	178	4.0
2. Ammonium sulphate	27	2.8
3. Ammonium sulphate (+ succinic acid 0.5%)	165	4.6
4. Ammonium carbonate	142	3.9
5. Ammonium phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	136	3.6
6. Ammonium sulphate (+ Calcium carbonate 0.4%)	128	6.3
7. Potassium nitrate: Ammonium sulphate		
a) 9.5:0.5	188	3.9
b) 9.0:1.0	185	3.9
c) 8.0:2.0	45	2.9
d) 7.0:3.0	31	2.8
e) 6.0:4.0	33	2.9
f) 5.0:5.0	27	2.9
g) 2.5:7.5	29	2.8

All nitrogen sources were supplied on equal nitrogen basis. Cultures were grown in Richard's medium supplemented with thiamine $5.0\text{ }\mu\text{g}$ and biotin $0.1\text{ }\mu\text{g}$ per flask for 18 days in 250 ml Erlenmeyer flasks with 25 ml medium per flask. Mycelia were dried at 65°C for 48 h and dried to constant weight in a dessicator over anhydrous calcium chloride. Initial pH of the media was adjusted to 6.0 in each case.

medium at the optimum level during growth. The foregoing findings indicate that the ability of fungi to utilize different forms of nitrogen would depend on the pH changes during growth and in light of this, the classification of fungi based on their utilization of different forms of nitrogen suggested by ROBBINS⁴ may have to be modified as already suggested by BRIAN *et al.*³.

I thank Prof. T. S. SADASIVAN and Dr. C. V. SUBRAMANIAN for guidance and Mr. K. LAKSHMINARAYANAN for suggestions.

A. APPARAO

University Botany Laboratory, Madras-5, India, December 30, 1955.

Zusammenfassung

Eine Reinkultur des Reisparasiten *Piricularia oryzae*, der Stickstoff aus Nitraten benutzen, nicht aber aus stark ionisiertem anorganischem Ammoniak ausnützen kann, entwickelte sich besonders günstig, wenn die Wasserstoffkonzentration während des Pilzwachstums genau kontrolliert wurde.

⁴ W. J. ROBBINS, Amer. J. Bot. 24, 243 (1937).

¹ L. H. LEONIAN and V. G. LILLY, Amer. J. Bot. 34, 131 (1940). – P. R. BURKHOLDER and I. McVEIGH, Amer. J. Bot. 34, 634 (1940). – P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, and H. C. HEMMING, Proc. roy. Soc. [B] 135, 106 (1947). – K. BERNHARD and H. ALBRECHT, Helv. chim. Acta 30, 627 (1947). – H. S. REISCHER, Mycologia 43, 319 (1951). – L. MACHLIS, Amer. J. Bot. 40, 189 (1953). – J. HACSAYLO, V. G. LILLY, and H. L. BARNETT, Mycologia 46, 691 (1954).

² L. MACHLIS, Amer. J. Bot. 40, 189 (1953).

³ P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, and H. C. HEMMING, Proc. roy. Soc. [B] 135, 106 (1947).

Animalisation de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* par des substances polysulfoniques

Au cours de travaux antérieurs¹, nous avons mis en évidence les effets animalisants des colorants acides sur le développement de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Les colorants étudiés appartiennent à deux séries chimiques distinctes: série azoïque avec le rouge Congo, le bleu et le rouge Trypan et dérivés du triphénylméthane avec le bleu à l'eau et le bleu de méthyle. Ces colorants présentent en commun des propriétés acides liées à la présence de groupes sulfoniques. Leur effets animalisants communs, malgré leurs différences de structures apparaissent ainsi étroitement liés à la présence de ces groupes sulfoniques. Afin d'étendre et de préciser cette relation nous examinons ici des substances dont la molécule porte plusieurs groupes sulfoniques. Il s'agit du chlorazol sky blue (Colour index N. 518) et de la Germanine (Bayer 205). Le chlorazol sky blue appartient au groupe des colorants azoïques et porte 4 groupes sulfoniques par molécule. La Germanine est une polyamide de poids moléculaire élevé, portant deux groupes terminaux acides naphthalénepolysulfoniques.

Le chlorazol sky blue est très soluble dans l'eau. A la concentration $1/5000$, le rythme de la division cellulaire n'est pas modifié. L'éclosion est retardée. Les embryons présentent les caractères morphologiques de l'animalisation. Ce sont des blastulas sphériques avec l'épaississement apical très marqué s'étendant très largement latéralement. L'extension considérable de la touffe ciliée apicale accompagne celle de l'épaississement apical. Les cils sont extrêmement longs, flexueux et mobiles. Leur activité imprime à l'embryon un mouvement de propulsion hélicoïdale autour de l'axe animal-végétatif. L'archentéron est absent, ainsi que les spicules. Un groupe de cellules mésenchymateuses, rondes, intensément colorées en bleu, est localisé au pôle végétatif.

Quelques cellules mésenchymateuses, de forme étoilée, tapissent la face interne du blastocèle. Elles sont colorées en bleu pâle. Des cellules pigmentaires rondes sont dispersées également contre les parois du blastocèle. Les parois ectodermiques sont colorées en mauve. Les cultures dans le chlorazol sky blue présentent une très grande homogénéité, tous les embryons étant animalisés au même degré. Comparée à celle des témoins, leur viabilité est élevée. Après 48 h, ces embryons ont conservé leur structure, et des cils courts très mobiles recouvrent toute leur surface. Dans quelques cultures, les embryons outre les caractères morphologiques que nous venons de décrire, se signalent par la présence d'un ou plusieurs petits bourgeons courts, pleins, au pôle végétatif. Ces bourgeons sont très nettement colorés en bleu et possèdent souvent, inclus dans leur masse, une ou deux cellules pigmentaires. Dans les solutions plus diluées, $1/25000$ par exemple, les embryons sont radialisés de façon caractéristique: le lobe préoral très large et allongé est bordé d'un ectoderme épais garni de longs cils. Le champ anal est entouré d'une bande ciliée. L'archentéron non segmenté occupe une position axiale. Les spicules, au nombre de 4 à 6 en général, sont ramifiés et forment une couronne entourant l'archentéron dans sa région moyenne. La radialisation est également observée dans les solutions à $1/100000$. Même à ces dilutions élevées, les effets du colorant sont remarquable-

ment homogènes, toutes les larves présentant les mêmes caractères. Le chlorure de lithium à dose convenable s'oppose aux effets animalisants du chlorazol sky blue.

La Germanine, utilisée à concentration $1/5000$ inhibe l'invagination, l'archentéron reste de petite taille. Ultérieurement celui-ci peut d'ailleurs s'évaginer plus ou moins. Ni la plaque apicale, ni la touffe ciliée qui le recouvre ne présentent l'extension caractéristique de l'animalisation. En solution plus concentrée, $1/1000$, $1/500$ et $1/100$, la Germanine retarde notablement l'éclosion et les larves sont animalisées. Ce sont des blastulas sphériques avec un épaississement ectodermique apical très agrandi s'étendant en direction latérale et recouvert de longs cils. Les caractères de l'animalisation sont développés au maximum dans les solutions de Germanine à $1/100$. L'archentéron manque dans toutes ces larves. Des cellules mésenchymateuses rondes sont localisées au pôle végétatif. Les spicules et les cellules pigmentaires manquent. Ces cultures sont très homogènes, tous les embryons présentant le même type morphologique. La viabilité de ces embryons, assez faible, est inversement proportionnelle à la concentration de la solution.

Si l'on compare les effets du chlorazol sky blue d'une part et de la Germanine d'autre part, avec ceux des colorants précédemment étudiés, on remarque que, à concentration égale, les effets du chlorazol sky blue sur le développement sont comparables à ceux obtenus avec les colorants sulfonés de la série azoïque. Les résultats obtenus avec le chlorazol sky blue sont toutefois plus homogènes qu'avec ces derniers. Il est probable que la nature colloïdale du bleu trypan et du rouge Congo en ralentissant leur pénétration dans l'embryon, diminue leur efficacité. Ces remarques apparaissent encore plus nettement dans le cas de la Germanine. Cette substance n'étant pas colorée, il n'est pas possible de mettre directement en évidence sa présence dans l'embryon, mais il est fort probable qu'en solution diluée, la Germanine ne puisse pénétrer à l'intérieur de l'embryon. Ceci n'exclut évidemment pas une fixation de la Germanine à la surface de l'embryon. Une élève de RUNNSTRÖM, WIKLUND² a montré en effet que la Germanine inhibe la fécondation. Cette réaction impliquerait une fixation de la Germanine à la surface de l'œuf. Le fait qu'aux concentrations peu élevées, la Germanine n'ait accès qu'aux structures superficielles de l'œuf et de l'embryon joint à la constatation que ces faibles concentrations ne provoquent pas l'animalisation, permet de penser que la pénétration de la Germanine à l'intérieur de l'embryon et sa combinaison avec des éléments intracellulaires sont nécessaires pour obtenir l'animalisation des larves. Une étude parallèle portant sur les propriétés animalisantes des ions zinc nous a permis d'établir un rapprochement entre le mode d'action des ions des métaux lourds et les colorants sulfoniques et la participation des groupes basiques des protéines (LALLIER³). Outre la présence de ces groupes sulfoniques, la nature du squelette moléculaire intervient dans l'activité de ces substances. C'est sans doute leur noyau dérivé du triphénylméthane, qui confère leur toxicité aux bleus d'aniline sulfonés. La taille de la molécule joue également un rôle important. Les recherches de WILLS⁴ ont mis en évidence des différences de réactivité vis-à-vis des protéines et des enzymes, en particulier entre différentes substances mono- ou polysulfoniques, selon qu'elles existent à l'état d'ions ou de micelles. Ces données appliquées au problème de

¹ R. LALLIER, C. r. Soc. biol. 148, 1730 (1954); Exper. Cell Res. 9, 232 (1955).

² E. WIKLUND, Ark. Zool. 6, 485 (1954).

³ R. LALLIER, J. Embryol. exp. Morph. (sous presse).

⁴ E. D. WILLS, Biochem. J. 57, 109 (1954).

l'animalisation apparaissent susceptibles d'en éclaircir le mécanisme.

Les substances à groupements sulfoniques provoquent également la radialisation des larves. GUSTAFSON et SÄVHAGEN⁵ l'ont observée avec différents détergents. Nous avons d'autre part montré que les colorants sulfoniques exerçant un effet radialisant en solutions diluées, sont de puissants agents animalisants aux concentrations plus élevées. Cette relation s'observe également avec certains ions de métaux lourds chez *Paracentrotus lividus* (LALLIER⁶). La radialisation apparaît ainsi comme une forme mineure de l'animalisation.

R. LALLIER

Institut de Biologie Physico-chimique, Paris, le 6 mars 1956.

Summary

The effects of two compounds with sulfonic acid groups, chlorazol sky blue and Germanin (Bayer 205), are being studied on the developing egg of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. The chlorazol sky blue ($1/5000$) is a very effective animalizing agent. In dilute solutions ($1/25000$ and $1/100000$), it induces the development of radial larvae. The lithium chloride counteracts the animalizing effects of chlorazol sky blue. The Germanin has an animalizing effect only at high concentrations. The penetration of these agents appears essential for the animalization. The reaction of the sulfonic acid groups with the basic groups of the intracellular proteins appears to be concerned with the animalizing effect. The results of these experiments are discussed in relation to the animalizing effects of various sulfonated dyes and zinc ions.

⁵ T. GUSTAFSON et R. SÄVHAGEN, Ark. Zool. 42 A, N° 10, 1-6 (1950).

⁶ R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 75 (1955).

Effect of Seed Treatment on Sex Expression in the Cucumber

Investigations conducted by various authors, as reviewed by LEOPOLD¹ showed that treatment of seeds with plant growth substances, whether followed by vernalization or not, resulted in earlier flowering in a number of plant species. In preliminary studies² only plant growth substances were utilized, while in later experiments³ the combined effect of auxin and cold treatment, a case of "chemical vernalization", was investigated. Chemical vernalization proved effective in peas, as well as in other plants.

In attempts to change the "sex tendency"⁴, i.e., the ratio between pistillate and staminate flowers of a given individual, in the cucumber, a monoecious species, the petioles of the lower leaves were cut and the cut sur-

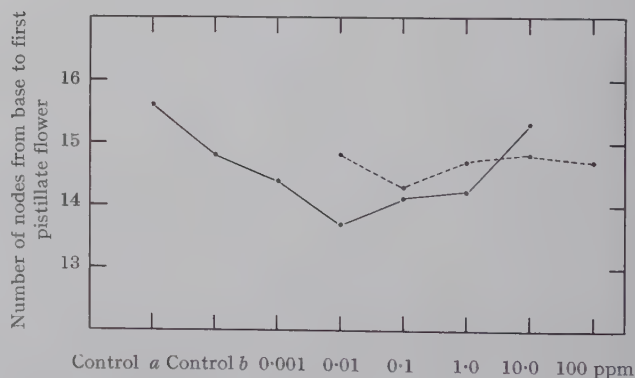
faces of the plant were treated with auxin paste⁵. This treatment brought about an increase in sex tendency.

Data accumulated in our laboratory⁶ show, that the number of nodes preceding the first pistillate flower on the main axis of a cucumber plant is a good indicator of sex tendency. Indeed, node number is less variable than the pistillate/staminate ratio, used previously by other workers to denote sex expression. Furthermore, while the latter is obtained by counting numerous flowers on each plant, quite a time-consuming procedure, node number can be determined in a few seconds. The effect of seed treatment on sex tendency in cucumbers was therefore studied by following the change in node number. The subject of the present paper will be confined to the effect of seed treatment upon node number. The relationship between node number and sex expression will be discussed in detail elsewhere⁶.

The Table shows the results of an experiment conducted in 1954. Two varieties of cucumbers were used: Yorkstate and Beit-Alpha. Samples of seed, soaked in various solutions of naphthaleneacetic acid (NAA), ranging in concentration from 0.001 to 1.0 ppm, were placed under laboratory conditions for 18 h, they were then maintained at 3°C for 3 days and planted in the open field. During the blooming period, the mean node number to the first pistillate flower was calculated on the basis of 10 plants per treatment. The data show that cold treatment alone is effective in reducing the node number of the variety Yorkstate, but not significantly so in the case of the variety Beit-Alpha. The 0.1 ppm NAA solution has the most pronounced effect on node number in both varieties, while the highest concentration of NAA (1.0 ppm) delayed the appearance of the first pistillate flower.

It should be emphasized that chemical treatment alone, applied in another experiment, had no effect on node number.

Additional tests, carried out in 1955, confirmed essentially the results obtained during the previous year. Indoleacetic acid (IAA) which was included in these trials produced an effect similar to, but less pronounced than NAA.



The effect of chemical vernalization on the occurrence of the first female flower on the main axis of *Cucumis sativus* L. (var. Packer). Control a: without cold treatment; control b: with cold treatment. Smooth line: NAA; broken line: MH; (LSD at 5% level = 1.04; at 1% level = 1.41).

¹ A. C. LEOPOLD, *Auxins and Plant Growth* (University of California Press, 1955).

² P. S. TANG and S. W. LOO, Amer. J. Bot. 27, 385 (1940).

³ A. C. LEOPOLD and F. S. GUERNSEY, Amer. J. bot. 41, 181 (1954).

⁴ O. SHIFRIS, *Genetics*, 1956 (in press).

⁵ F. LAIBACH and F. J. KRIBBEN, Ber. dtsh. Bot. Ges. 67, 53 (1950).

⁶ O. SHIFRIS and E. GALUN, Proc. Amer. Assoc. hort. Sci. 1956 (in press).

The effect of chemical vernalization on the average node number in two cucumber varieties (Mean $\pm$ Standard error).

Variety	Control <i>a</i> (No cold)	Control <i>b</i> (Cold treated)	0.001 ppm NAA	0.01 ppm NAA	0.1 ppm NAA	1.0 ppm NAA
Yorkstate	9.2 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.1	
Beit-Alpha	7.3 $\pm$ 0.4	6.6 $\pm$ 0.6	6.6 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.3

The results of an experiment with the cucumber variety Packer are represented graphically in the Figure. Samples of seed, soaked in solutions of NAA varying in concentration from 0.001 to 10 ppm, or in solutions of maleic hydrazide (MH), the concentration of which ranged from 0.01 to 100 ppm, were placed under laboratory conditions for 21 h; they were then maintained at 6°C for 8 days and planted in the field. The mean node number of the 32 to 40 plants subjected to each of the treatments was found. The analysis of variance showed that the least significant difference (LSD) was 1.04 at the 5% level and 1.41 at the 1% level. Whereas NAA solutions of 1.0, 0.1, 0.01 and 0.001 ppm cause a significant reduction in node number, the 0.01 ppm solution of NAA causes a highly significant reduction as compared with control *a* (without cold treatment). In the latter case the reduction was also significant as compared to control *b* (with cold treatment). According to the Figure, control *b* appears to reduce node number but the effect is not statistically significant. Increasing the concentration of the NAA solution from 1.0 to 10.0 ppm delays the appearance of the first pistillate flower. The MH had no appreciable effect on the node number.

THIMANN and LANE⁷ regard vernalization as the “prolonged exposure of the seed to its internal auxin supply”. This may be interpreted as meaning that in cold-treated soaked seed the auxin retains its potential properties, while its destruction is very slow. Therefore, chemical vernalization seems to produce effects similar to, but stronger than auxin treatment alone.

The effect of chemical vernalization on the number of nodes preceding the first pistillate flower in the cucumber is similar to the influence of chemical vernalization on the number of nodes preceding the first perfect flower in peas, as reported by LEOPOLD and GUERNSEY⁸. This raises the question as to whether or not the position of these two different flower types is determined by the same factor.

ESRA GALUN

The Weizmann Institute of Science Rehovot, January 30, 1956.

Résumé

Il a été trouvé que l’immersion des graines de concombres dans des solutions d’auxines végétales de concentrations déterminées, suivie d’un traitement par le froid, peut amener dans la plante adulte un changement dans les manifestations du sexe. La relation possible entre ce traitement et la vernalisation ordinaire est brièvement discutée.

⁷ K. V. THIMANN and R. H. LANE, Amer. J. Bot. 25, 535 (1938).

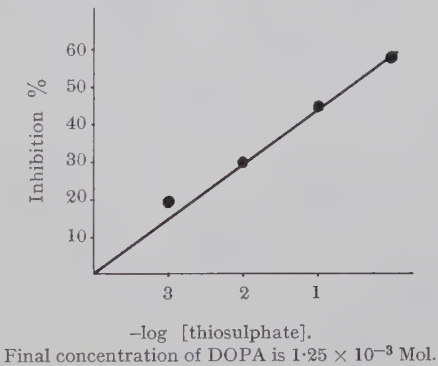
Studies on a Polyphenolase in *Scopolia japonica* III
On the Inhibition of DOPA Oxidation

It was previously reported¹ by the author that a polyphenolase prepared from the subterranean stem of *Scopolia japonica* catalyzed the aerobic oxidation of DOPA to form a melanine-like substance, whereas it did not catalyze the oxidation of L-tyrosine².

The present report deals with the effects of various inhibitors on the activity of this enzyme preparation.

The subterranean stems of plants were washed and peeled. About 30 g of this material was blended with 150 ml of cold phosphate buffer (M/30). It was filtered through gauze, centrifuged for 30 min at 4000 rpm and the sediment discarded. The supernatant liquid (I) was either assayed directly for polyphenolase or was partially purified (II) by acetone precipitation and dialysis in the cold for 24 h against distilled water.

Fig. 1.—Inhibition of DOPA oxidation by thiosulphate.



The effects of various inhibitors upon the oxidation of DOPA are listed in the Table. It has been shown previously³ that the inhibition of polyphenoloxidase by phenylthiourea is typical, but that cytochrome oxidase activity is little inhibited by this reagent. According to the present experiment, the oxidation of DOPA by the polyphenolase is much inhibited by this substance at a lower concentration.

The inhibitory effect of sodium diethyldithiocarbamate (which is a precipitant almost specific of copper) was more pronounced than with cyanide. On the other hand, carbon monoxide with 5% oxygen mixtures caused 73% inhibition, most of which was non-reversible by light, and this is characteristic of polyphenoloxidases⁴. This enzyme, therefore, is probably concerned with the copper.

¹ Y. SUZUKI, Bot. Mag., Tokyo 68, 227 (1955).
² Y. SUZUKI, Bot. Mag., Tokyo (in press).
³ K. P. DUBOIS and W. F. ERWAY, J. biol. Chem. 165, 711 (1946).
⁴ O. WARBURG, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten (Berlin 1949).

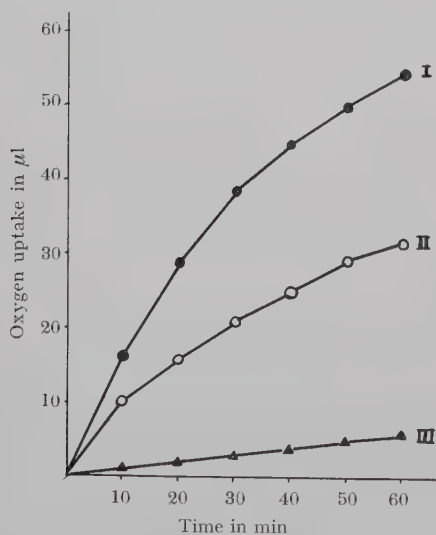
Inhibition of DOPA oxidation by various substances.

Inhibitors	Final concentration (Mol)	Inhibition % (in 60 min)
Sodium diethyldithiocarbamate	0.25×10^{-2}	96
Cyanide.	0.25×10^{-2}	38
Phenylthiourea . . .	Saturate/4	84
95% CO with 5% O ₂ .	in light	73
<i>p</i> -Nitrophenol	0.5×10^{-3}	10
Phenylthiourea . . .	Saturate/4	95
Salicylaldehyde . . .	0.25×10^{-2}	20
<i>p</i> -Nitrophenol	Saturate/4	31
8-Oxyquinoline . . .	Saturate/4	20

The activity of the enzyme was determined by measuring oxygen uptake in the Warburg apparatus at 35 °C and pH 7.3, taking 1.0 ml of the enzyme preparation, 1.0 ml of inhibitor and others in the main chamber; 0.5 ml of DL-dihydroxyphenylalanine solution in the sidearm of a flask, the total volume of liquids being made to 4.0 ml. The center well contained 0.3 ml of 10% KOH; the gas phase was air.

Salicylaldehyde⁵, *p*-nitrophenol⁶ and 8-oxyquinoline⁷ are known as sensitive reagents against some copper enzymes which are responsible for the terminal step in the biological oxidation, but inhibition by these inhibitors is not very extensive.

Fig. 2.—Inhibition of DOPA oxidation by thioglycolate.



Curve I. DOPA only (final concentration 1.25×10^{-3} Mol).

Curve II. DOPA plus thioglycolate (final concentration 0.25×10^{-3} Mol).

Curve III. DOPA plus thioglycolate (final concentration 0.25×10^{-2} Mol).

According to FLESCH⁸ the formation of melanine in the animal is inhibited by sulfhydryl compounds, the extent of inhibition being dependent on the concentration of the inhibitor.

⁵ F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 292, 221 (1937).

⁶ J. BONNER and S. G. WILDMAN, Arch. Biochem. 10, 497 (1946).

⁷ E. STOTZ, C. J. HARRER, and C. G. KING, J. biol. Chem. 119, 511 (1937).

⁸ P. FLESCH, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 70, 136 (1949).

In the present experiment the oxidation of DOPA by the polyphenolase (I) was inhibited by thiosulphate and thioglycolate. The former is the simplest of sulfhydryl compounds⁹. Its inhibitory effect, as is shown in Figure 1, supports the conclusion by FLESCH. The effects of thioglycolate are shown in Figure 2.

Copper ions are known to be sensitive to thiol enzymes. The inhibition by thiosulphate and thioglycolate, therefore, might be concerned with the prosthetic group of the polyphenolase.

YONEZO SUZUKI

Biological Institute, Toyama University, Toyama, Japan, January 20, 1956.

Zusammenfassung

An einer aus *Scopolia japonica* isolierten Polyphenolase wurde die Wirkung verschiedener Hemmstoffe studiert. Cyanid und Salicylaldehyd wirkten relativ schwach, Diäthylthiocarbamat, Phenylthioharnstoff und Kohlenoxyd hemmen die Oxydation stark. Der Ablauf der Hemmwirkungen von Thiosulfat und Thioglycolat wird kurvenmässig dargestellt.

⁹ J. HIRAIDE, Progressive Study of SH Group (in Japanese) (Tokyo 1954).

Further Data on the Evaluation of Platelet Ac-globulin and its Plasmatic Origin

In the past few years, many authors have described a platelet accelerator factor which has been called Platelet Ac-globulin (or factor I). The action of this accelerator is similar to that of Plasma Factor V, and accelerates the speed of transformation of prothrombin and thrombin. Such a factor, according to some authors¹, is present in the platelets in a form which is already active, and acts in a way similar to the Serum Ac-globulin (or factor VI). Also, considering some of the physical chemical characteristics, there is an analogy between Platelet Ac-globulin and Plasma Ac-globulin. It is destroyed by heat at 56°C for 30 min, and is not dialyzed. It has been prepared in concentrated form and it has been shown to act like a protein. The activity of this accelerator has been established to be less than that of the Plasma Ac-globulin, and even though qualitatively equal, it seems that it is quantitatively equivalent to $1/8$ – $1/16$ of the accelerator activity of Plasma Ac-globulin: such values vary considerably according to different authors. According to OWREN, the platelets possess only 6% of the accelerator activity of plasma. Recent researches² suggest that the accelerator factor of the platelets is adsorbed Plasma Ac-globulin (or factor V). The platelets of a para-haemophilic patient do not contain accelerators, but can acquire such an activity after having been in contact with normal plasma. Trypsin destroys almost completely Platelet Factor I, without altering platelets. If the platelets thus treated are placed in contact with a normal plasma, they recover all of the lost activity.

¹ A. G. WARE, J. L. FAHEY, and W. H. SEEGER, Amer. J. Physiol. 154, 140 (1948).

² P. HJORT, S. I. RAPAPORT, and P. A. OWREN, Blood 10, 1139 (1955).

During the past few years, we have tried to elaborate a simple method for the quantitative determination of the Platelet Ac-globulin, according to procedures also used for the determination of Plasma Ac-globulin³. The results obtained by OWREN, have suggested a revision of the problem, so as to be able to determine the Ac-globulin contained in the platelets, whatever its origin may be. We used a technique obtained by modifying the Thromboplastin Generation Test of BIGGS and DOUGLAS⁴.

In order to generate an active thromboplastin, there must be present an optimal quantity of platelets, AHG, PTC, PTA, Factor V, Factor VII, and calcium. All these factors contribute to produce an active thromboplastin similar to that which is generated during the normal processes of coagulation. When one of them is diminished or absent, generation of thromboplastin is incomplete and insufficient⁵.

The following reagents are necessary:

(1) The platelets have been isolated with a technique previously described by employing siliconized glassware. The blood is withdrawn rapidly, using sequestrene in the proportion of $\frac{1}{9}$, then centrifuged at slow speed for 10 min. The supernatant plasma is separated and placed in a centrifuge tube containing triton in proportion of $\frac{1}{9}$, then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The platelets sediment is resuspended in saline to a concentration of 400,000/cm³, and is stored at + 4°C until used. It is advisable to make the determinations within the first hour after preparation.

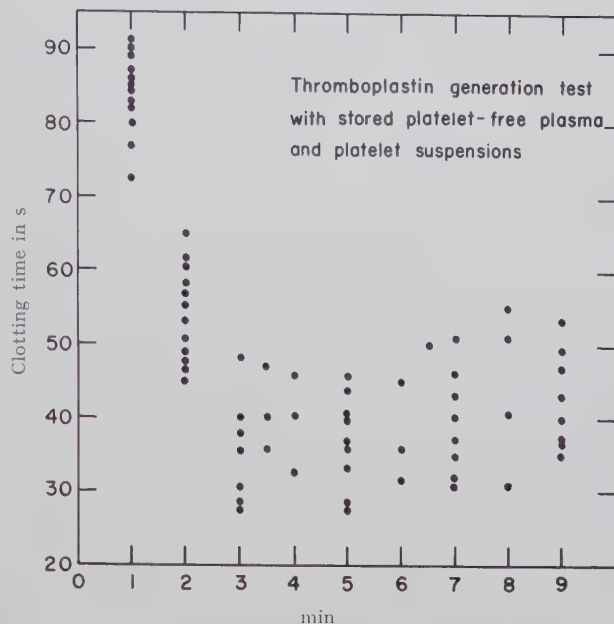
(2) The plasma used in this test is prepared in the following way: The plasma of different subjects with normal recalcification and prothrombin times is mixed. This plasma is then kept at 37°C for 24 h until the prothrombin time has been prolonged to about 40 s. In such conditions Plasma Factor V has been shown to be almost absent. The plasma is then deprothrombinized with barium sulfate, and is placed in a refrigerator at - 20°C until used. The conservation time of this plasma should be not longer than 5–6 days.

(3) The serum is prepared by mixing many normal, old sera with no residual prothrombin; this preparation is kept at - 20°C until used and lasts for a few weeks.

(4) The platelet-free plasma is prepared by centrifuging a normal plasma for 30 min at 3000 rpm in glassware accurately siliconized. After this treatment the plasma must have a recalcification time which varies between 5–9 min.

(5) The calcium chloride solution is prepared to a molar solution of $\frac{1}{40}$.

The technique for the study of the accelerator activity of the platelets is as follows: in a test tube kept in a water bath at 37°C, 0.3 cm³ of plasma are placed which contains a small quantity of prothrombin and factor V, diluted $\frac{1}{5}$ in saline; 0.3 cm³ of platelet suspension to be examined; 0.3 cm³ of serum diluted $\frac{1}{10}$ in saline, and finally 0.3 cm³ of calcium chloride. At the time of adding the calcium chloride, a stopwatch is started, and at each successive minute, 0.1 cm³ of the mixture is removed and is placed rapidly in a test tube previously prepared and ready in the water bath at 37°C, and which contains 0.1 cm³ of the plateletfree plasma. At the same time, 0.1 cm³ of the calcium chloride solution is added to



this mixture and a second stopwatch is started. The coagulation time is measured and the results can be transferred to a coordinate system. Since there is a determination every minute, the phenomenon can be followed up till 8–10 min, and it is possible to prepare a curve, which, when compared to a standard curve, allows us to determine the percentage of thromboplastin formed. Thromboplastin formation is not detectable in the absence of factor V (Plasma Ac-globulin). Since factor V has been removed from the plasma, the quantity of thromboplastin formed should be in relation to the percentage of Ac-globulin contained in the platelets examined. We have performed a series of determinations with the above technique on isolated platelets in a group of 12 individuals and we have ascertained that the activity of the Ac-globulin contained in the platelets is similar to that of the Plasma Ac-globulin, but is quantitatively reduced.

The generation curves of the thromboplastin vary within the limits of 10 s; this finding is referable to the different quantity of Ac-globulin adsorbed by the platelets, which therefore carry different quantities of the accelerating factor. On the basis of some researches now in progress, it seems that the content of the Ac-globulin in the platelets may be subordinated to its plasmic concentration and *vice versa*. The data of OWREN indicated that in cases of plasma Ac-globulin deficiency, the platelets are devoided of such factor, i.e. that they were not able to absorb Ac-globulin. Some of our recent preliminary researches have suggested that some cases of marked platelet deficiency may be associated with a deficient Plasma Ac-globulin, possibly in connection with a possible function of the platelets as carriers of Ac-globulin⁶.

R. TURPINI

Department of Internal Medicine, University, Pavia,
December 18, 1955.

³ P. DE NICOLA, R. TURPINI, and F. WEBER, Z. ges. inn. Med. Grenzgeb. (in press).

⁴ R. BIGGS and A. S. DOUGLAS, J. clin. Path. 6, 23 (1953).

⁵ C. L. SPURLING and P. D. W. KING, J. Lab. clin. Med. 44, 336 (1954).

⁶ At the time of printing we were informed by the Editor of *Experientia* about the just appeared paper by HÖRDER and SOKAL *Acta haematol.* 14, 294 (1955).

Zusammenfassung

Die Eigenschaften des Plättchen-Ac-Globulins wurden mit Rücksicht auf die Thromboplastinbildung untersucht.

Investigations on the ACTH-Protamine complex

One of the authors reported that protamine sulphate could, to a high degree, inhibit the action of ACTH on adrenal ascorbic acid and on the involution of the thymus¹. In the paper concerned it was mentioned that to clarify the mode of action of protamine in this respect, the authors have carried out electrophoretic and paper chromatographic investigations. The results of these investigations are as follows:

Methods. (1) In the electrophoretic investigations the materials were run on Macherey-Nagel paper No. 214 with a stabilized direct current of 4–10 V/cm voltage and of 2–4 mA intensity for 8–16 h. An acetate buffer of pH 4.7 and of 0.1–0.03 ionic strength and a borate buffer of pH 8.6 and of 0.1 ionic strength was used. The paper strips were dyed with 0.2% acid fuchsine diluted in absolute alcohol containing 10% acetic acid. The differentiation was carried out with methanol containing 10% acetic acid and with 10% acetic acid.

(2) The paper chromatographic investigations were carried out in the case of the polypeptides in a phenol-water system, in the case of the hydrolysates in a phenol-water system or in a butanol-acetic acid-water system. The polypeptides were indicated with acid fuchsine, the amino acids with ninhydrine.

(3) The frog melanophore investigations were carried out on frogs decolorized with light, according to a method modified by the authors². The sensitivity of the method renders it possible to measure the quantities of the materials eluted from the chromatograms. The main point of the method is that the darkening of the frogs (resulting from the action of ACTH or from the melanophore content of ACTH) is measured by comparison with a fixed scale of 1–10. Each determination was carried out at 3 dose levels on 10 frogs per dose. The experiments were evaluated by repeated comparison with a standard (cross-over test).

(4) The ACTH of protein type was produced according to SAYERS, WHITE and LONG³, the peptide type material was produced by acidic hydrolysis of a material prepared according to ASTWOOD, PAYNE and RABEN⁴.

(5) Pure protamine sulphate was prepared by purification of commercial protamine sulphate with oxycellulose and by precipitation with hot water. Its purity was checked by chromatographic investigations of the hydrolyzed product.

Results. In the electrophoretic investigations the diverse ACTH products split up—according to their types—into different components. Purified protamine sulphate proved to be homogenous.

In case of simultaneous running of both materials a new component appeared. A complete separation of the latter and its investigation was not possible however, since it could not be delimited from the components of ACTH.

In chromatographic investigations it was established that ACTH progressed together with the solvent, and protamine sulphate appeared as a homogenous fixed spot. In the case of simultaneous running of both materials the appearance of a new component in the form of a well defined spot was observed. The investigation of the complex-forming capacity of different ACTH types showed that in the case of materials of the protein type the greater part of the ACTH activity, in the case of hydrolyzed products only a small part of it was incorporated in the complex (Figure).



Ascending chromatograms. 1 Protamine sulphate. 2 ACTH. 3 Protein ACTH + Protamine sulphate. 4 Peptide ACTH + Protamine sulphate.

This phenomenon was indicated on the one hand by the size of the spot, on the other hand by the melanophore assay of the material eluted from the spots. By elution of the complexes with *n*/100 sulphuric acid it was established that the amino acids characteristic for ACTH could be found in their hydrolysates, and on the other hand the great quantity of arginine indicated the presence of protamine.

The different abilities of different ACTH preparations to form protamine complexes were also studied in investigations where the depletion of adrenal ascorbic acid (Sayers test⁵) was found to be influenced by protamine; in the case of protein type materials the effect of eightyfold quantities of ACTH could be inhibited by pretreatment with protamine, in the case of peptide type materials by only a two-threefold quantity⁶.

The observations resemble those of KREBS who could—by application of salmine—essentially diminish the

¹ Gy. FEKETE, *Acta med. Acad. Sci. Hung.* 8, 81 (1955); *Exper.* 11, 310 (1955).

² A. HEGYELI (in press).

³ G. SAYERS, A. WHITE, and C. N. H. LONG, *J. biol. Chem.* 149, 425 (1943).

⁴ E. B. ASTWOOD, R. W. PAYNE, and M. S. RABEN, *J. biol. Chem.* 187, 719 (1950).

⁵ G. SAYERS, M. A. SAYERS, and L. G. WOODBURY, *Endocrinology* 42, 379 (1948).

⁶ Gy. FEKETE, J. NURIDSÁNY, and A. HEGYELI (in press).

activity of phosphorylase-a. He observed, however, that in the case of phosphorylase-b, produced by the hydrolysis of the enzyme, this effect did not occur⁷. From these facts it may be concluded that either ACTH itself must be of a high molecular weight to be able to form a protamine complex, or protamine does not directly effect ACTH but exerts the complex-forming and *in vivo*-inhibiting effect by means of the carrier protein of ACTH which is hydrolyzed in the case of our peptide type materials. The investigations will be reported in detail elsewhere.

GY. FEKETE and A. HEGYELI

Dept. of Pharmacology, Chem. Works of G. Richter Ltd.
Dept. of Biochemistry, Pharmacoindustrial Research Institute, Budapest, Hungary, February 21, 1956.

Zusammenfassung

Der Mechanismus der Verhinderung des ACTH-Effektes durch Protaminsulfat wurde untersucht. Papierchromatographisch konnte festgestellt werden, dass beide Substanzen einen Komplex bilden und infolgedessen ACTH seine Aktivität verliert. Während die proteinartigen ACTH-Präparate starke komplexbildende Eigenschaft besitzen, vermögen die peptidartigen Präparate nur in geringem Masse Komplexe zu bilden. Dies konnte auch durch *in-vivo*-Verhinderungsversuche (Sayers test) mit beiden Präparaten bestätigt werden.

⁷ E. G. KREBS, Biochim. biophys. Acta 15, 508 (1954).

Etude de l'activité adénosinetriphosphatique et hexokinase de cristallins de lapins soumis à une irradiation locale par les rayons X*

Dans le cadre de nos recherches sur les effets biochimiques des radiations, nous avons étudié l'action des rayons X sur l'activité hexokinase et adénosinetriphosphatique (ATPasique) du cristallin de lapin. L'œil droit était soumis à une irradiation locale. (Dose: 1400 r. Tension: 220 kv. Intensité: 12 mA. Débit: 70 r/min. Filtre: 3 Al. Distance foyer-peau: 30 cm. Surface de localisation: 20 mm.) L'œil gauche était protégé et son cristallin servait de témoin. Après le sacrifice des animaux par saignée, les cristallins immédiatement prélevés ont été refroidis et les activités enzymatiques étudiées par des méthodes manométriques décrites ailleurs¹. Les résultats de nos essais sont consignés dans les Tableaux I et II. Il résulte de l'examen du Tableau I que l'activité hexokinase est considérablement abaissée à la suite de l'irradiation et cette réduction persiste pendant longtemps. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au niveau de la peau par MANDEL et RODESCH². Ainsi contrairement à ce qui a été observé avec de l'hexokinase

* Travail effectué avec le concours matériel de l'Institut National d'Hygiène.
¹ P. MANDEL, C. A. QUARANTA et Mme. M. L. SCHMITT, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 139 (1956) et 37, 847 (1955).
² P. MANDEL et J. RODESCH, J. Physiol. 47, 234 (1955).

Tableau I
Activité hexokinase de cristallins normaux ou soumis à une irradiation locale par les rayons X chez le lapin

Expérience n°	Traitement	Durée jours	μM CO ₂ dégagées en 20 min/100 g de poids frais	Différence en %
1	non	—	52	— 77
	1400 r	2	12	
2	non	—	112	— 67
	1400 r	2	37	
3	non	—	77	— 100
	1400 r	2	0	
4	non	—	102	— 88
	1400 r	4	12	
5	non	—	87	— 37
	1400 r	4	55	
6	non	—	50	— 70
	1400 r	4	15	
7	non	—	75	— 87
	1400 r	4	10	
8	non	—	145	— 31
	1400 r	103	100	
9	non	—	115	— 52
	1400 r	108	55	
10	non	—	55	— 100
	1400 r	113	0	
11	non	—	55	— 81
	1400 r	113	10	

Tableau II
Activité adénosinetriphosphatique de cristallins normaux ou soumis à une irradiation locale par les rayons X chez le lapin

Expérience n°	Traitement	Durée jours	μM CO ₂ dégagées en 30 min/100 g de poids frais	Différence en %
1	non	—	85	+ 254
	1400 r	2	300	
2	non	—	235	+ 64
	1400 r	2	380	
3	non	—	145	+ 45
	1400 r	2	210	
4	non	—	270	0
	1400 r	3	270	
5	non	—	230	+ 73
	1400 r	3	395	
6	non	—	150	+ 90
	1400 r	4	285	
7	non	—	280	+ 18
	1400 r	4	330	
8	non	—	175	— 14
	1400 r	7	150	
9	non	—	225	+ 8,5
	1400 r	8	250	
10	non	—	170	+ 77
	1400 r	65	300	
11	non	—	260	+ 2
	1400 r	68	265	
12	non	—	235	+ 68
	1400 r	69	395	
13	non	—	265	+ 9,5
	1400 r	70	240	

irradiée *in vitro*³, cet enzyme s'avère très sensible aux rayons X.

³ E. S. G. BARON, S. DICKMAN, J. A. MUNTZ et T. P. SINGER, J. gen. Physiol. 32, 537 (1949). — E. S. G. BARRON, Ann. N. Y. Acad. Sci. 59, 574 (1955).

L'activité ATPasique est accrue entre le 2^e et le 4^e jour après l'irradiation, à une exception près (Tableau II). Au-delà du 4^e jour, les différences ne sont pas homogènes. L'augmentation de l'activité ATPasique constatée les premiers jours après l'irradiation est en accord avec les faits observés par ASHWELL et HICKMANN⁴ et VAN BEKKUM⁵ au niveau de la rate chez la souris blanche et par DUBOIS et PETERSEN⁶ au niveau de la rate et du thymus chez le rat et la souris mâle. Cette majoration de l'activité ATPasique pourrait être rapprochée d'un accroissement similaire mis en évidence dans le cristallin d'animaux diabétiques⁷. Nous l'avons interprété dans ce cas comme une adaptation enzymatique tendant à contrebalancer certains blocages de la dégradation des glucides. Il pourrait en être de même dans les suites après irradiation. Notons encore que le comportement des deux enzymes étudiés *in vivo* s'avère nettement différent de celui *in vitro*. Dans ce dernier cas, on a signalé en effet que l'hexokinase résiste mieux aux rayons X que l'ATPase.

P. MANDEL et Mme M. L. SCHMITT

Institut de chimie biologique et clinique ophtalmologique, faculté de médecine, Université de Strasbourg, le 23 février 1956.

Summary

The irradiation of the lens by a simple dose of 1400 r, gives a very important and lasting reduction of its hexokinase activity. Its ATPase activity shows an increase during the first four days and a return to normal again. The variations observed here (that is *in vivo*) are different from the ones noted after irradiation of these enzymes *in vitro*.

⁴ G. ASHWELL et J. HICKMANN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 80, 407 (1952).

⁵ D. W. VAN BEKKUM, Biochim. biophys. Acta 16, 437 (1955).

⁶ K. P. DUBOIS et D. F. PETERSEN, Amer. J. Physiol. 176, 282 (1954).

⁷ P. MANDEL, Mme. M. L. SCHMITT et C. A. QUARANTA, C. r. Acad. Sci., Paris 242, 193 (1956).

ATPase Activity of Guinea Pig Heart Muscle

The occurrence of several different types of enzymes splitting ATP in animal tissue has been recently described. Biochemical differences among those enzymes concern principally pH optimum, stimulating cations and reaction products. Quite recently, HEPPEL and HILMOE¹ have succeeded in separating three different ATPases from bull seminal plasma. One of these enzymes hydrolyzes ATP to AMP and PP. It is relatively heat-stable, has pH optimum between 8.4 and 8.8 and requires neither Ca⁺⁺ nor Mg⁺⁺ for full activity. The second ATP-splitting enzyme produces *ortho* P and ADP from ATP and has an acid pH optimum. It is completely destroyed by heating at 60°C for 20 min, requires Mg⁺⁺ and is inhibited by Ca⁺⁺. The third enzyme is a relatively heat-stable alkaline phosphatase which releases *ortho* P from ATP and is more stimulated by Ca⁺⁺ than by Mg⁺⁺.

¹ L. A. HEPPEL and R. J. HILMOE, J. biol. Chem. 202, 217 (1953).

The importance of ATP and ATPase in muscular contraction has been particularly emphasized in recent years (SZENT-GYÖRGYI², MOMMAERTS³, NEEDHAM⁴). Some features of muscular ATPase have been then extensively studied. All the above-mentioned authors agree that muscular ATPase shows two pH optima for enzymic activity: the first one is near pH 6.5; the second is much stronger and develops in the presence of Ca⁺⁺ at pH 9.2. Ca⁺⁺ acts as an activator at both pH values; the action of Mg⁺⁺ is, by contrast, still a matter for discussion. BANGA and SZENT-GYÖRGYI⁵ have discovered that pure myosin and actomyosin with lower actin contents are always inhibited by Mg⁺⁺, whereas actomyosins with higher actin contents can be activated.

The purpose of the present investigation was to study the characteristics of ATPase from guinea pig heart muscle. In order to establish it there are differences in enzymic activity in regions of the heart provided with different functions, ATPase activity of both ventricles and atria were studied separately.

Methods.—Male guinea pigs weighing 250–300 g and fed on a standard diet were used. The animals were killed by bleeding and the heart was immediately removed and transferred into the cold room at 2°C. Both ventricles and atria were separated and weighed. 1% homogenates were then prepared by grinding the minced tissues in a Potter-Elvehjem homogenizer with a leucite pestle. 0.067 M borate buffer was used as a suspension medium.

ATPase activity was determined according to the method of DUBOIS and POTTER⁶ with some modifications described elsewhere⁷. Two pH optima indicated by MOMMAERTS (6.5 and 9.2) were particularly investigated. Incubation temperature was 37°. ATP sodium salt was prepared in solution from dibarium salt supplied by SCHWARZ. Its final concentration was 0.01 M. The values reported in the Tables are given as $\mu\text{g P/mg N}$. P. determinations were made according to the method of FISKE and SUBBAROW⁸ and N determinations by the usual microkjeldhal technique. The values obtained were analyzed statistically, standard deviation and the "t" test of STUDENT-FISHER being calculated for each average.

Results.—In a first group of experiments the normal values of ATPase of atria and ventricle homogenates of guinea pig heart were established. ATPase activity was studied without the addition of activating cations at two pH optima 6.8 and 9.2. As shown in Table I, ATPase activity is much stronger at pH 9.2 than at pH 6.8, as the enzyme from skeletal muscle does. No remarkable differences in activity of different parts of the heart were noticed at pH 9.2. At pH 6.8 the activity of the atria is, however, stronger than that of the ventricles.

In a second group of experiments the influence of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ was studied. The results are represented in Fig. 1 and 2. It is clear that the action of both ions depends upon their concentration and that the activity maximum corresponds always to a low concentration, whereas at

² A. SZENT GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction* (Academic Press, New York, 1950).

³ W. E. H. M. MOMMAERTS, *Muscular Contraction* (Interscience, New York, 1950).

⁴ D. M. NEEDHAM, *The Biochemistry of Muscle* (Methuen, London, 1953).

⁵ I. BANGA and A. SZENT GYÖRGYI, Stud. Inst. med. Chem. Szeged 1, 5 (1942).

⁶ K. P. POTTER and V. R. DUBOIS, J. biol. Chem. 150, 185 (1953).

⁷ M. A. MOR, Exper. 9, 9 (1953).

⁸ C. H. FISKE and Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

Table I

Influence of CaCl_2 and MgCl_2 on ATPase activity at pH 6.8 and 9.2. The values are given as $\mu\text{g P/mg N}$ delivered in 15 min at 37°C , $\pm$ standard deviation. 10 experiments with CaCl_2 , 8 with MgCl_2 .

Activator added	Activator concentration	pH 6.8				pH 9.2			
		L. ventr.	L. atria	R. ventr.	R. atria	L. ventr.	L. atria	R. ventr.	R. atria
— — —	— — —	48 $\pm$ 5	79 $\pm$ 4	58 $\pm$ 3	85 $\pm$ 7	103 $\pm$ 6	122 $\pm$ 8	140 $\pm$ 11	127 $\pm$ 9
CaCl_2	9.6×10^{-4}	59 $\pm$ 4	87 $\pm$ 4	73 $\pm$ 5	91 $\pm$ 5	150 $\pm$ 6	131 $\pm$ 6	180 $\pm$ 5	143 $\pm$ 7
CaCl_2	1.6×10^{-3}	50 $\pm$ 2	99 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4	110 $\pm$ 6	139 $\pm$ 4	125 $\pm$ 5	178 $\pm$ 6	133 $\pm$ 6
CaCl_2	3.3×10^{-3}	50 $\pm$ 4	75 $\pm$ 5	64 $\pm$ 4	85 $\pm$ 3	141 $\pm$ 5	137 $\pm$ 5	167 $\pm$ 5	148 $\pm$ 5
CaCl_2	5×10^{-3}	50 $\pm$ 2	—	55 $\pm$ 3	—	105 $\pm$ 4	160 $\pm$ 6	132 $\pm$ 4	171 $\pm$ 6
CaCl_2	6.6×10^{-3}	50 $\pm$ 3	78 $\pm$ 3	57 $\pm$ 2	87 $\pm$ 4	111 $\pm$ 5	135 $\pm$ 5	141 $\pm$ 5	144 $\pm$ 3
CaCl_2	8.3×10^{-3}	50 $\pm$ 4	80 $\pm$ 3	58 $\pm$ 3	89 $\pm$ 4	110 $\pm$ 5	116 $\pm$ 4	144 $\pm$ 3	124 $\pm$ 4
MgCl_2	9.6×10^{-4}	79 $\pm$ 5	95 $\pm$ 6	85 $\pm$ 5	130 $\pm$ 5	152 $\pm$ 4	167 $\pm$ 8	190 $\pm$ 8	179 $\pm$ 7
MgCl_2	1.6×10^{-3}	63 $\pm$ 3	105 $\pm$ 5	70 $\pm$ 5	136 $\pm$ 6	140 $\pm$ 6	145 $\pm$ 6	188 $\pm$ 5	175 $\pm$ 7
MgCl_2	3.3×10^{-3}	50 $\pm$ 3	80 $\pm$ 4	76 $\pm$ 3	122 $\pm$ 5	154 $\pm$ 6	125 $\pm$ 6	170 $\pm$ 6	156 $\pm$ 6
MgCl_2	5×10^{-3}	46 $\pm$ 4	77 $\pm$ 5	60 $\pm$ 4	129 $\pm$ 7	169 $\pm$ 8	140 $\pm$ 8	165 $\pm$ 7	150 $\pm$ 9
MgCl_2	6.6×10^{-3}	35 $\pm$ 3	68 $\pm$ 4	57 $\pm$ 3	120 $\pm$ 6	150 $\pm$ 8	135 $\pm$ 7	165 $\pm$ 7	150 $\pm$ 8
MgCl_2	8.3×10^{-3}	44 $\pm$ 3	80 $\pm$ 6	62 $\pm$ 3	110 $\pm$ 5	110 $\pm$ 7	120 $\pm$ 4	168 $\pm$ 9	152 $\pm$ 7

higher values the activation disappears. Some difference of behaviour between atria and ventricles was observed also with respect to Ca^{++} and Mg^{++} stimulation at different pH values.

In the case of Ca^{++} and pH 6.8 (Table I and Fig. 1) the curves of two atria and ventricles are very similar: they start from low values, rise slightly with increasing Ca^{++} concentration until they reach a maximum at $1 \times 10^{-3} \text{ M}$,

and then descend abruptly towards rather constant values which are somewhat lower than those observed in the absence of added Ca^{++} . The maximum of activity of ventricular ATPase is only slightly displaced towards lower concentrations of Ca^{++} , with respect to that observed in the case of atrial ATPase. Furthermore, the right ventricle shows a second maximum at higher concentrations. At pH 9.2 (Table I and Fig. 1) also the Ca^{++}

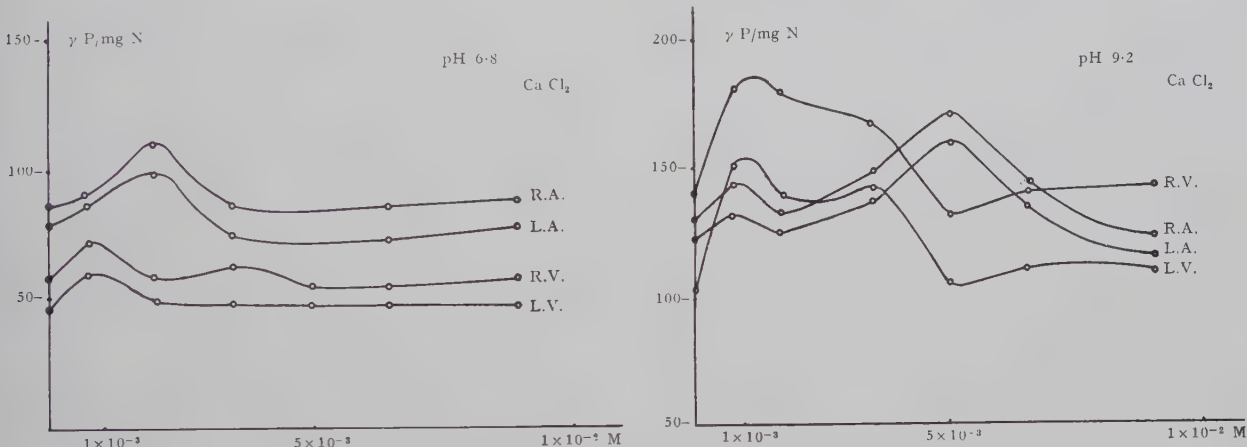


Fig. 1.—Influence of CaCl_2 at pH 6.8 and 9.2

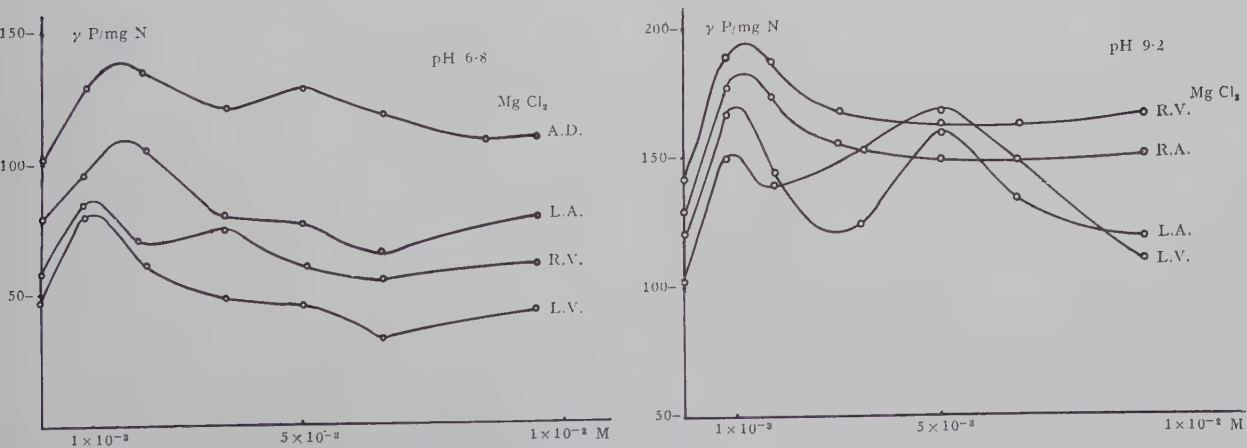


Fig. 2.—Influence of MgCl_2 at pH 6.8 and 9.2

Table II
Influence of heating at 60°C (pH 6.8 and 9.2). 5 experiments.

min	pH 6.8				pH 9.2			
	L. ventr.	L. atria	R. ventr.	R. atria	L. ventr.	L. atria	R. ventr.	R. atria
5	40 ± 4	75 ± 4	50 ± 4	75 ± 3	77 ± 5	92 ± 5	112 ± 6	102 ± 6
10	26 ± 2	50 ± 3	37 ± 3	50 ± 3	51 ± 4	62 ± 3	78 ± 2	62 ± 2
15	18 ± 2	40 ± 2	24 ± 2	40 ± 2	26 ± 2	48 ± 2	38 ± 3	38 ± 3
20	11 ± 3	22 ± 2	12 ± 1	19 ± 1	2 ± 1	15 ± 3	5 ± 2	5 ± 2

has a different action on ATPase activity of atria and ventricles. In all four curves maximum values occur at low concentrations, but the forms of the curves show striking differences between atria and ventricles. In fact, ventricles show only one maximum, while the atria have two maxima: a little one occurring at low concentrations, and a second which is high and wide and occurs at high concentrations. Mg^{++} exerts very similar influences on both left atrium and left ventricle as well as on right atrium and right ventricle.

In the presence of Mg^{++} at pH 6.8 right atrium and right ventricle show two well-defined maxima, while left ventricle and left atrium have only one. (Table II and Fig. 2). At pH 9.2, on the other hand, left ventricle and left atrium have two maxima, whereas right atrium and ventricle have only one maximum at low concentrations (Table I and Fig. 2).

In the last group of experiments the extent of destruction of enzyme after heating at 60° was studied. The homogenates were incubated at 60°; small aliquots were taken up at 5 min intervals and ATPase activity was determined. The results are shown in Table II. It is clear from this Table that heart ATPase is heat-labile and is completely destroyed in 20 min at 60°. No difference of behaviour between atria and ventricles was observed.

Conclusions.—It seems probable from these investigations that ATPase activity of guinea pig heart results from the sum of at least two different enzyme activities, each provided with different cation requirements. The first is active at pH 6.8, is stimulated more by Ca^{++} than by Mg^{++} and is especially abundant in the atria; the second is stimulated by Ca^{++} as well as by Mg^{++} in about the same amounts and seems to be most important in ventricles. Ca^{++} stimulation reveals striking differences between the activities of atria and ventricles at both pH; Mg^{++} stimulation seems to exert different actions in the right and in the left heart. However, inactivation by heating proceeds in the same manner in all parts of the guinea pig heart. It seems not improbable that the differences of ATPase activity occurring in atria and in ventricles are due to their functional differences.

MARIA ASSUNTA MOR

Institute of General Pathology, Genoa, November 22, 1955.

Riassunto

L'Autore ha studiato l'influenza della concentrazione degli ioni Ca^{++} e Mg^{++} sull'ATPasi degli atri e dei ventricoli di cuore di cavia. Tale attività è maggiore a pH 9,2 che a pH 6,8. Mentre il Ca^{++} influisce differenziando decisamente le attività degli atri da quelle dei ventricoli, il Mg^{++} accentua piuttosto una differenza tra la parte destra e la sinistra. Il calore distrugge quasi completamente l'attività enzimatica dopo una permanenza a 60° per 20 min.

Quantitative Determination of Acetylcholinesterase Activity in Individual Megakaryocytes at Various Stages of Maturation

It has been shown that the enzyme acetylcholinesterase (AChE), present in man in the erythrocyte-erythropoietic cells, in rabbit, rat and cat is concentrated in the platelet-megakaryocytes¹. In a previous report the AChE of the megakaryocytic cell system was investigated with a histochemical technique². It was thereby shown that the megakaryoblast, which has a diameter of about 24 μ and is the earliest-known precursor cell of megakaryocytes, contains considerable amounts of AChE. The strongest histochemical reaction, however, was exhibited at the promegakaryocyte-megakaryocyte stage when the cells attain a diameter of about 42 to 56 μ . In a suspension of bone-marrow cells these maturation stages of megakaryocytes can readily be differentiated by light microscopy. This cell system, therefore, constitutes an ideal medium for studying the problem of the synthesis of a specific enzyme during the maturation of the somatic cells.

Very recently a micro diver technique has been evolved³, with which it is possible to make quantitative determination of the AChE activity in single cells. Mature megakaryocytes from different mammals were studied in this way⁴ as were nerve cells⁵. The present paper reports quantitative determination of AChE activity in individual megakaryocytes at various stages of maturation and isolated from rat bone marrow. The enzyme activity is expressed as the amount of CO_2 evolved in 1 h from the bicarbonate buffer by the acetic acid formed in the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine (AThCh).

The AChE activity of individual megakaryocytes at various stages of maturation is shown in Figure 1. It is seen that even megakaryoblasts, which are about 24 μ in diameter, show measurable amounts of AChE. At the megakaryoblast-promegakaryocyte stage (24–42 μ) the cells show widely varying AChE content. Most cells are very active in splitting AThCh, but some show remarkably low AChE activity. At these developmental stages the megakaryocytes also display great variations in intracellular structure. All intermediate forms ranging from cells with a large, round nucleus surrounded by small amounts of coarse cytoplasmic matter to cells with a polymorphic nucleus and finely granulated cytoplasm were encountered. Attempts to correlate the various levels of AChE activity with particular cell structures, however, have so far been unsuccessful.

¹ J. ZAJICEK, B. SYLVÉN, and N. DATTA, *J. Histochem. Cytochem.* 2, 115 (1954).

² J. ZAJICEK, *Acta haemat.* 12, 238 (1954).

³ J. ZAJICEK and E. ZEUTHEN, *Exper. Cell Res.* (in press).

⁴ J. ZAJICEK, *Acta haemat.* 15, 296 (1956).

⁵ E. GIACOBINI and J. ZAJICEK, *Nature* 177, 185 (1956).

Megakaryocytes which had reached a diameter of about 45 μ all show a polymorphic nucleus surrounded by a large disc of homogeneous, finely granulated cytoplasm. In studying individual megakaryocytes it was noted that at the megakaryoblast-promegakaryocyte stage spherical cells became flattened in the final phases of maturation. This process suggests a decrease of the cell mass per cross-section area and also that the increased size of megakaryocytes in the final stages of maturation may not entail an increase of the total cell mass. Recent interferometric mass determinations⁶ have in fact shown that the amounts of dry substance per μ^2 area are much lower in the mature (largest) megakaryocytes (0.57×10^{-12} g/ μ^2) than in the smaller cells (0.82×10^{-12} g/ μ^2). Figure 1, however, shows that in the final maturation stages rapid enhancement of AChE activity takes place. It is thus possible that this represents a process similar to that discussed by THORELL⁷ in regard to the synthesis of haemoglobin, which was considered to begin mainly after the formation of basic cellular protein-substances is accomplished.

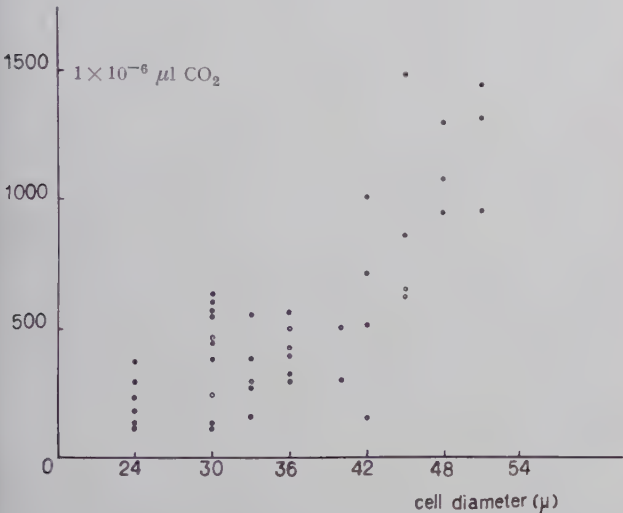


Fig. 1.—Acetylcholinesterase activity of individual megakaryocytes at various stages of development. The enzyme activity is expressed as $1 \times 10^{-6} \mu\text{l CO}_2$ evolved from the substrate bicarbonate solution in one h.

The variability of enzyme content in megakaryocytes of apparently similar degree of maturation (shown in Fig. 1) can also readily be demonstrated by histochemical means. In Figure 2 a modified¹ thiocholine method for AChE determination⁸ has been applied to a group of megakaryocytes at the 30–36 μ stage. The megakaryocyte at the top of the figure shows high AChE activity, while a similar cell in the right lower corner displays only slight histochemical reaction. After being photographed, the megakaryocytes in Figure 2 were washed in 0.9% NaCl and placed in divers for quantitative determination of AChE. The cell with high histochemical activity was found to liberate from the substrate bicarbonate solution about $550 \times 10^{-6} \mu\text{l CO}_2$ per h and the cell with little histochemical activity only about $120 \times 10^{-6} \mu\text{l}$. Whether the low AChE activity of the second cell

was due to slower enzymatic synthesis or to temporary inactivation of the enzyme—active centra being combined with other molecules (templates) in order to reduplicate themselves—is not known, and cannot be elucidated from the data herein presented.

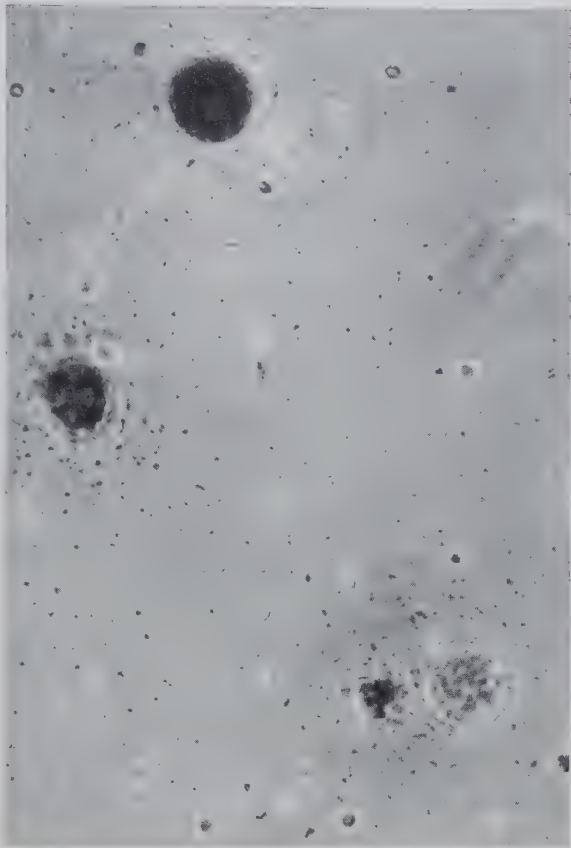


Fig. 2.—Histochemical demonstration of AChE activity in a group of megakaryocytes of rat bone marrow 30 to 36 μ in diameter. The megakaryocyte in the upper section of the photograph shows a highly positive histochemical reaction, whereas a similar cell in the right lower corner appears to have little activity (phase-contrast $\times 350$).

The ribonucleic acids (RNA) have repeatedly been suggested as the template or pattern for specific protein synthesis⁹. Ultraviolet photometry of megakaryocytes at various stages of development has shown that parallel with maturation a continuous decrease of cytoplasmic nucleotide substances takes place⁶. The micromethod developed by EDSTRÖM¹⁰ for RNA determination in individual nerve cells has now been applied to megakaryocytes. The preliminary data indicate that the RNA concentration in megakaryocytes decreases greatly during maturation stages in which the rapid increase of AChE activity takes place. The possible relationship between the synthesis of AChE and the metabolic processes of RNA is under investigation.

J. ZAJICEK

Institute of Radiopathology, Radiumhemmet, Stockholm, Sweden, February 16, 1956.

⁶ N. DATTA, B. THORELL, and L. ÅKERMAN, *Acta haemat.* 14, 176 (1955).
⁷ B. THORELL, *Studies on the Formation of Cellular Substances During Blood Cell Production* (Kimpton, London 1947).
⁸ G. B. KOELLE and J. S. FRIEDENWALD, *Proc. Soc. exper. Biol. N. Y.* 70, 617 (1949).

⁹ For a recent review on the "template" hypothesis, the reader is referred to J. BRACHET, *The biological Role of the Pentose Nucleic Acids in "The Nucleic Acids"*, 2 (Acad. Press. Inc., N.Y.1955), 475.
¹⁰ J.-E. EDSTRÖM, *Biochim. biophys. Acta* 12, 361 (1953).

Zusammenfassung

Die Aktivität der Azetylcholinesterase von einzelnen Megakaryozyten verschiedener Reifegrade wurde mit Hilfe des Cartesischen Tauchers bestimmt. Die Megakaryozyten zeigen auf dem Megakaryoblasten- und Promegakaryozytenstadium grosse Unterschiede der Azetylcholinesteraseaktivität. In der letzten Phase der Reifung, wenn die Zellen einen Durchmesser von 45 μ erreichen, wird das Ferment am stärksten wirksam.

Post-heparin Esterase in Man

It is known that heparin has an influence on the enzymatic activity of serum and plasma. The nature of these changes has already been investigated¹. In the investigation described, the effect of heparin on the esterolytic activity of serum in man was observed. The esterase level was determined by the titrimetric method², using ethyl butyrate as substrate. Human blood serum was investigated before and 10–15 min after the injection of 5000 units of heparin intravenously. An increase of from 10 to 100% was found in 30 examinations. This finding was observed in both serum and plasma; heparin, however, acted only *in vivo*. When substrates other than ethyl butyrate were used, an increase was also observed with ethyl isobutyrate; with other esters, e.g. ethyl acetate, isopropyl acetate, butyl acetate, amyl acetate, triacetin and tributyrin, the increase was small or absent. The level of esterase rose as early as 2 min after injection, it then gradually fell; however a higher value was still evident after 60 min (Table I).

Table I

Time after injection minutes	Esterase ml 0.05 <i>n</i> NaOH
0	2.72
2	4.00
20	3.68
40	3.52
60	3.32

Table II

Concentration of NaF	Pre-heparin esterase ml 0.05 <i>n</i> NaOH	Post-heparin esterase ml 0.05 <i>n</i> NaOH
—	2.68	3.56
0.001 m	1.62	2.98
0.01 m	0.72	2.36
0.1 m	0.18	1.60
1 m	0.08	0.32

Post-heparin esterase acts at pH 7–11, a higher pH is more favourable to it. It is resistant to various in-

hibitors, e.g. NaF (Table II), physostigmine (10^{-3} m), diethyl-*p*-nitrophenylphosphate (10^{-5} m). Similarly, it shows a somewhat greater resistance to heat than the esterase of normal serum. Sodium taurocholate decreases its effectiveness. Similarly, protamine inhibits it *in vitro*. The effect of protamine, however, can be eliminated by the addition of heparin in excess.

J. SKOŘEPA and H. TODOROVIČOVÁ

IVth Medical Clinic, Prof. B. Prustk, Charles University, Praha, March 12, 1956.

Zusammenfassung

Es werden einige Eigenschaften der menschlichen Serumesterase nach Heparinapplikation beschrieben.

Tubular Factors in the Renal Response to Arterial Hypotension

The extreme oliguria in posthaemorrhagic hypotension is well known¹. In a previous communication² we were able to demonstrate that the posthaemorrhagic diminution of diuresis is less expressed in the transplanted, i.e. completely denervated kidney, than it is in its innervated partner. So the role of nervous impulses in the mechanism of posthaemorrhagic oliguria seems to be proved. There is no doubt that *one* of the factors responsible for oliguria is the reduced filtration rate (GFR), but an accurate analysis of our data³ suggested that an increase in tubular reabsorption is also involved in the process.

In a series of experiments performed on dogs under chloralose, innervated and transplanted kidneys were compared for renal bloodflow (RBF), GFR, renal resistance ($R = B.P./RBF$), and excretion of sodium and water. Part of the experiments were done in osmotic or saline diuresis, part of them without any diuretics at all. RBF was determined directly by cannulating the renal vein. GFR is the product of RPF (determined directly) and the extraction ratio of inulin. Measurements were made both in the basal state, i.e. with arterial pressure normal, and in hypotension induced by constriction of the aorta just above the origin of the renal arteries.

The results are tabulated (arithmetic means with s. d.). In the basal state there was no significant difference between the behaviour of the innervated and transplanted kidneys except for RBF, which was lower; consequently, resistance was higher in the transplanted kidney. After induction of a hypotension of about 70 mm Hg, RBF decreased to about 80% in both series, leading to a decrease of renal resistance. (The hypotensive values are expressed as percentages of the corresponding basal rates.) The response of the renal vessels to hypotension of the lower half of the body was

¹ S. W. LEVY and R. L. SWANK, *J. Physiol.* 123, 301 (1954); 127, 297 (1955). — D. K. MYERS, A. SCHOTTE, and B. MENDEL, *Biochem. J.* 60, 481 (1955).

² I. S. CHERRY and L. A. CRANDALL, *Amer. J. Physiol.* 100, 266 (1932).

³ A. C. CORCORAN and I. H. PAGE, *J. exper. Med.* 78, 205 (1943). — R. A. PHILLIPS, V. P. DOLE, P. B. HAMILTON, K. EMERSON, R. M. ARCHIBALD, and D. D. VAN SLYKE, *Amer. J. Physiol.* 145, 314 (1946).

² P. BÁLINT, A. FEKETE, K. LÁSZLO, and G. PINTÉR, *Acta physiol. Hung.* 6, 69 (1954).

³ P. BÁLINT, A. FEKETE, A. HAYDU, K. LÁSZLO, and G. PINTÉR, *Acta physiol. Hung.* 6, 81 (1954).

	Blood pressure	V/min	Na excr. aq./min	GFR	RBF	R
Hypotension induced by constriction of the aorta						
Innervated series (16 exp.)	109 ± 11	2·32 ± 1·41	254 ± 178	54 ± 21	472 ± 136	0·25 ± 0·08
	70 ± 6	11 ± 10%	11 ± 12%	63 ± 27%	80 ± 38%	88 ± 14%
Transplanted series (26 exp.)	121 ± 10	3·45 ± 2·92	309 ± 224	49 ± 14	332 ± 140	0·42 ± 0·11
	74 ± 9	32 ± 31%	25 ± 21%	75 ± 33%	79 ± 16%	80 ± 13%
Hypotension induced by bleeding						
Innervated series (34 exp.)	114 ± 16	2·31 ± 1·74	—	57 ± 24	464 ± 129	0·27 ± 0·31
	71 ± 7	18 ± 17%	—	62 ± 33%	55 ± 18%	130 ± 55%
Transplanted series (27 exp.)	117 ± 17	2·22 ± 1·66	—	39 ± 31	281 ± 171	0·49 ± 0·18
	75 ± 14	43 ± 33%	—	77 ± 31%	67 ± 18%	100 ± 34%

thus a vasodilatation in the innervated and transplanted kidney alike. This "autonomy" of the renal vessels has been described by various authors⁴.

A detailed account of our data is to be published in *Acta Physiologica Hungarica*.

P. BÁLINT, A. FEKETE, and S. SZALAY

*Physiological Institute of the University of Budapest,
November 22, 1955.*

Zusammenfassung

Although in hypotension GFR decreased to practically the same values in both series (35 for the innervated, 36 for the transplanted kidney), there was a significant difference (as computed by Fisher's "t"-test⁵) in the excretion of sodium and water. In the hypotensive period the innervated kidney excreted less sodium and water than the transplanted one. Since the filtration was equal, this difference can be attributed only to an enhanced tubular reabsorption of sodium and water by the innervated kidney.

Nach Verminderung des arteriellen Blutdruckes ist die Senkung der Natrium- und Wasserausscheidung grösser in der innervierten als in der denervierten (transplantierten) Niere. Es konnte festgestellt werden, dass der verminderte Blutdruck der unteren Körperhälfte bei gleicher Filtration eine vermehrte tubuläre Natrium- und Wasserreabsorption der innervierten Niere hervorruft.

According to our view, the renal response to hypotension of the lower half of the body consists of two effects. The first is an autonomous adaptation of the renal vessels in the form of vasodilatation, which is independent of innervation. The second effect is an enhanced reabsorption of sodium and water by the innervated tubuli, and this effect is absent in the transplanted kidney.

For comparison, in the lower half of the Table we present the data of our posthaemorrhagic experiments. In this case hypotension was induced in the whole animal. The decrease in RBF was more pronounced, and although resistance increased in the innervated kidney, it remained unchanged in the transplanted one. GFR, i.e. filtered load was about equal (34 for the innervated, 30 for the transplanted kidney) and oliguria was significantly more pronounced in the innervated kidney. That means that the enhanced tubular reabsorption of water must play a role in the posthaemorrhagic oliguria too.

The renal response to bleeding is thus a combination of two effects. The first is the vasoconstriction in the kidney brought about by the hypotension of the upper half of the body (according to GÖMÖRI⁶ by hypoxia of the brain). The consequence of this vasoconstriction is a reduction of GFR leading to some decrease in water excretion. The second effect seems to be the enhanced tubular reabsorption of water in the innervated kidney induced by a lowering of arterial pressure in the lower half of the body.

Actinomycetes Antagonistic to
Polyporus annosus Fr.

The root-rot of Norwegian spruce (*Picea abies*) and other conifers is a serious disease causing heavy financial losses in Scandinavian forests. The mode of infection of the fungus (*Polyporus annosus* Fr.) has not been established with certainty, but the general opinion is that the mycelium of the fungus is capable of growing in the soil, where it infests the dead tap root of spruce, thus entering the living roots and the stem.

However, in the laboratory it has so far not been possible to make the fungus grow in unsterilized soil, whereas the mycelium is able to grow in autoclaved soil. Experiments have therefore been made to find out whether any relationship could be traced between antagonistic micro-organisms in the unfested soil and the occurrence of the fungus. BJÖRKMAN¹ isolated a large number of soil fungi and tested them for their antagonistic effect on the growth of the mycelium of *Polyporus annosus*, and he found an apparent correlation between the occurrence of the mycelium and soil fungi without inhibiting effects. RENNERFELT² in a similar experiment

⁴ H. HARTMANN, S. L. ORSKOV, and H. REIN, *Arch. ges. Physiol.* 238, 239 (1937). – E. ÖPITZ and D. H. SMYTH, *Arch. ges. Physiol.* 238, 633 (1937). – E. E. SELKURT, *Amer. J. Physiol.* 147, 537 (1946). – R. E. SHIPLEY and R. S. STUDY, *Amer. J. Physiol.* 163, 750 (1950).

⁵ R. A. FISHER, *Statistical Methods for Research Workers*, 10th ed. (Oliver and Boyd, London 1946).

⁶ P. GÖMÖRI, A. G. B. KOVÁCH, M. FÖLDI, GY. SZABÓ, and Z. NAGY, *Acta physiol. Hung.* 4 suppl., 42 (1953).

¹ E. BJÖRKMAN, *Physiologia Plantarum* 2, 1 (1949).

² E. RENNERFELT, *Oikos* 1, 65 (1949). – E. RENNERFELT and S. K. PARIS, *Oikos* 4, 58 (1952).

found that more than one-third of the isolates (moulds and bacteria) had inhibiting effects on the *annosus* mycelium *in vitro*, one of them being *Trichoderma viride*, which was inhibiting at 22°C, but was itself overgrown by *P. annosus* at 12°C.

In the present investigation, a number of actinomycetes from Danish forest soil (with and without the occurrence of the fruiting bodies of *Polyporus annosus*) was isolated. Nearly half of the isolates showed antagonistic effects on the *annosus* mycelium *in vitro*; one of these isolated actinomycetes was used in the following experiments.

A series of bowls with sterile garden soil (air-dried, with the addition of sufficient water to obtain a good crumb condition, pH after autoclaving, 7.0) was inoculated with suspensions of spores of the actinomycete (*Streptomyces* sp.) and subsequently incubated for 7 days at 22°C. A control series of bowls with sterile but uninoculated soil was run. In all bowls—in both series—a young agar culture of *annosus* mycelium grown on a slide was then placed after the incubation period, with the mycelium side downwards on the surface of the soil. After a few days, the mycelium in the control series began to spread over the free surface of the soil, but in the series inoculated with *Streptomyces* sp. little or no growth of *Polyporus annosus* from the edges of the slides was observed.

The experiments were repeated, with the difference that instead of slide cultures, 10 mm diameter agar disks cut from Petri dish cultures of *P. annosus* were used. The inhibition in these experiments was very marked.

It is not possible to make any conclusion from the experiments described here as to the more complex conditions in nature, but it may be justifiable to advance the theory that actinomycetes in natural soils may be partially responsible for the non-occurrence of *Polyporus annosus* in some areas in the forests. In this connection it is reasonable to ask if it would not be possible to stimulate the flora of actinomycetes in forest soil or give it a favourable trend by the addition of suitable green manures.

T. VINCENTS NISSEN

The Royal Veterinary and Agricultural College, Department of Plant Pathology, Copenhagen, Denmark, and the Royal Technical University of Denmark, Department of Technical Biochemistry, February 20, 1956.

Zusammenfassung

Eine Reihe von Actinomyceten aus dänischen Waldböden wurden auf antagonistische Wirkung gegen den Wurzelfäulnispilz, *Polyporus annosus* Fr., geprüft. Einer der isolierten Organismen wirkte auch in sterilem Boden hemmend auf das Myzel von *Polyporus annosus*. Die Möglichkeit wird erwähnt, den Wurzelfäulnispilz im infizierten Boden durch Förderung des Actinomycetenwachstums mit Gründüngung zu beeinflussen.

Studies on the Ascorbic Acid and Carotene Content in Leaves as a Common Characteristic of Botanically Related Species

It has been observed that there are plant families with a high ascorbic acid content, while other families

are markedly poor in this vitamin. Thus, a high anti-scorbutic activity has been noted in leaves of Cruciferae, while on the other hand Compositae were found to contain relatively small amounts of vitamin C¹. No study has so far been undertaken of the carotene content in leaves as a common property of plants belonging to the same family, but it has been observed that the carotene and chlorophyll content of higher plants run parallel with the ascorbic acid content². This has been explained through the possibility of a certain functional correlation of vitamin C and these pigments³.

The present communication concerns the results of an examination of the ascorbic acid and carotene content in leaves, which was carried out on a large scale as a part of systematic studies on the vitamin value of edible wild plants growing in Yugoslavia. This work includes the examination of 74 plant species from 26 families, the results being tabulated and made known in two previous publications⁴. Altogether 503 analyses of ascorbic acid and 200 carotene determinations have been carried out. However, the present study is limited to 7 plant families only; the number of species investigated of the remaining 19 families is too small to permit any general conclusions. Ascorbic acid was determined by titration of the metaphosphoric acid extract with 2,6-dichlorophenol-indophenol, according to a standard procedure⁵. Carotene was determined by the method described by CURTIS⁶, based on the chromatographic adsorption of the petroleum ether extract on a column of soluble starch. It was calculated as beta-carotene, which accounts for about 90% of the total carotene in fresh leaves⁷. Both determinations were carried out with fresh samples immediately after gathering.

In Table I the results obtained by leaf analysis of the 7 plant families are summarized. Since a single species has been analyzed 4–12 times for vitamin C and 2–6 times for the carotene content, only the average values are given in the Table.

As to the ascorbic acid content of Cruciferae and Compositae, Table I confirms the values reported in the literature cited above. The Cruciferae examined were rich (average 182 mg%), and Compositae relatively poor (average 37 mg%) in this vitamin. According to our results it seems probable that there are also families distinguished by a relatively high carotene content (Leguminosae and Labiatae). However, in general, the amounts of ascorbic acid and carotene usually vary considerably within the same family, the differences between various species being sometimes very marked. On the basis of the data obtained, it will be hardly possible to classify categorically each plant family as more or less rich in the ascorbic acid or carotene content. We often found species belonging to one family "rich" in vitamin C whose leaves contained much smaller quantities of ascorbic acid than did the average of the family. In the leaves only of such plants we also often found a

¹ T. HIRAOKA, Seiri Seitai 1, 61 (1947). – A. SEYBOLD and H. MEHNER, Sitz.-Ber. Heidelberg. Akad. Wiss. math.-naturw. Klasse 1948, 213.

² J. C. DRUMMOND, H. J. CHANNON, and K. H. COWARD, Biochem. J. 19, 1047 (1925). – H. EULER, V. DEMOLE, and P. KARRER, Z. physiol. Chem. 183, 43 (1932). – O. A. BESSEY and C. G. KING, J. biol. Chem. 103, 687 (1933).

³ A. GIROUD and A. R. RATSIMAMANGA, Acide ascorbique vitamine C (Paris 1942), p. 123.

⁴ Lj. GRILIĆ, Acta pharm. Jugosl. 2, 112 (1952); 4, 115 (1954).

⁵ Methods of Vitamin Assay, Association of Vitamin Chemist Inc., (2nd ed., New York 1951), p. 76.

⁶ O. F. CURTIS, Plant Physiol. 17, 133 (1942).

⁷ A. HUZITA and M. AZISAKA, Biochem. Z. 308, 430 (1941).

Table I

Plant family	Number of species investigated	Number of samples analyzed		Values obtained in mg%			
		Ascorbic acid	Carotene	Ascorbic acid		Carotene	
				Range	Average	Range	Average
Polygonaceae	8	53	20	60–163	105	4·9–15·6	9·7
Chenopodiaceae	4	25	11	29–153	95	2·4–12·8	9·5
Cruciferae	11	70	24	92–334	182	6·1–13·8	8·5
Leguminosae	5	32	16	67–175	129	9·2–22·0	13·9
Umbelliferae	5	29	13	20– 99	76	2·1–13·9	7·5
Labiatae	3	20	7	41– 83	56	10·9–21·5	15·2
Compositae	10	74	29	19– 51	37	5·1–12·5	8·5

decreased carotene content, so that the amounts of the two constituents were parallel, and the ascorbic acid/carotene ratio (a/c) remained nearly the same as in other plants of the family. A striking example showing the approximate constancy of the a/c ratio were plants of xerophytic structure. The leaves of *Salsola Kali* L., for example, were proportionally much poorer in both vitamins than the other Chenopodiaceae examined. In Table II the calculated ratio of the ascorbic acid/carotene content (a/c), for the plant families examined, is shown.

Table II

Plant family	The calculated a/c ratio	
	Range of the species examined	Average of the family
Polygonaceae	9·2–12·2	10·8
Chenopodiaceae	8·8–12·1	10·0
Cruciferae	11·8–34·5	21·4
Leguminosae	7·3–12·3	9·3
Umbelliferae	6·3–16·5	10·1
Labiatae	3·3– 3·9	3·7
Compositae	2·6– 6·5	4·4

In Table II a certain tendency to constancy in the a/c ratio can be observed. By comparing the data of the two tables, the a/c ratio seems to be less variable and more characteristic of a given family than the ascorbic acid or carotene content itself. While the amounts of ascorbic acid and carotene in various Polygonaceae, for example, varied quite considerably (from 60 to 163 and from 4·9 to 15·6, resp.), the a/c ratio in various species of this family remained rather constant (from 9·2 to 12·2). Such is the case also with Chenopodiaceae, Leguminosae, Labiatae and Compositae. Cruciferae and Umbelliferae showed, however, a much wider range in this ratio. It is interesting to note that 4 of 7 families examined have an average a/c ratio of nearly 10. Since the vitamin content of plant tissues varies within species between very wide limits and is influenced by many factors (soil, shade, moisture, season, stage of growth etc.), it is obvious that no conclusion concerning the exact quantitative correlation between ascorbic acid and carotene in plants can be drawn here. However, from the data of our tables it is readily apparent that the ascorbic acid/carotene ratio shows within plant families a greater tendency towards constancy than do the concentrations of these constituents themselves. This fact seems to support the view that there may be a closely

connected functional interrelationship between these two constituents in plants.

LJ. GRLIĆ

Institute for Drug Control, Zagreb, Yugoslavia, November 25, 1955.

Résumé

Les résultats des dosages parallèles d'acide ascorbique et de carotène dans les feuilles des espèces appartenant à 7 familles ont démontré une tendance à la stabilité de la proportion acide ascorbique/carotène chez les plantes apparentées. La stabilité de cette proportion chez les espèces d'une seule famille est plus marquée que celle de la teneur même des deux substances. Ce fait semble pouvoir confirmer l'idée d'une corrélation étroite dans l'action des deux substances en question.

Über die Einwirkung des Schilddrüsenhormons auf die Ossifikation

Hinsichtlich der Frage von Beziehungen der Schilddrüsenfunktion zum Kalkstoffwechsel, insbesondere über eine etwaige Einwirkung des Schilddrüsenhormons auf den Kalzifikationsvorgang bei der Knochenbildung, gehen die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen weit auseinander: SCHULZE¹ entwickelt die Vorstellung, dass nur die Derivate des Ektoderms und des Entoderms auf den Thyroxinreiz anzusprechen vermögen, KELLER², FOX und IRVING³ und KALTENBACH⁴ haben in ihren Experimenten Hinweise auf eine Förderung der Ossifikation durch das Schilddrüsenhormon erhalten. Für die experimentelle Klärung dieses Problems ergeben sich folgende Fragestellungen: 1. Sind bei einer durch Verabreichung von Schilddrüsenhormon ausgelösten, vorzeitigen Metamorphose bezüglich der Kalk-einlagerung im Stützgewebe Veränderungen festzustellen, die denjenigen bei der experimentell unbeeinflussten Verwandlung entsprechen? 2. Sind bei einer lokalen Thyroxineinwirkung örtlich begrenzt Veränderungen in bezug auf die Kalkeinlagerung festzustellen? Larven von *Salamandra salamandra quadrivirgata* Dürigen wurden im geburtsbereiten Stadium dem Ute-

¹ W. SCHULZE, Roux' Arch. 101, 338 (1924).
² R. KELLER, Rev. Suisse Zool. 53, 329 (1946).
³ E. FOX und J. T. IRVING, S. Afr. J. med. Sci. 15, 11 (1950).
⁴ J. C. KALTENBACH, J. exp. Zool. 122, 21 (1953).

rus entnommen. Im Alter von 20 Tagen wurde den Versuchstieren Gelegenheit gegeben, im Aquarienwasser gelöstes Thyroxin (Roche) durch die unverletzte Haut aufzunehmen. Es entwickelten sich Tiere, die in Gestalt, Färbung und Verhalten völlig solchen Salamandern glichen, die nach ungekürztem Ablauf der Larvenperiode eine Umwandlung zum Landtier erfahren. Demgegenüber hatten unter gleichen Bedingungen, aber ohne Thyroxineinwirkung gehaltene Kontrolltiere in vollem Umfange ihre larvalen Merkmale beibehalten.



Abb. 1. Kalzifikation des Skeletts bei *Salamandra s. quadrivirgata* (Aufhellungspräparat, Alizarinfärbung), Vergrößerung 1,25 $\times$.
a Versuchstier (Thyroxin-Einwirkung), b Kontrolle.

Auch in Bau und Struktur des Skeletts zeigen die nach einer Modifikation des Spalteholz'schen Verfahrens mit Alizarin angefärbten und aufgehellten, vorzeitig metamorphosierte Salamander charakteristische Unterschiede gegenüber unbehandelten Larven (Abb. 1). Das Kopfskelett erscheint nicht nur infolge eines näheren Zusammenrückens der einzelnen Schädelknochen, sondern auch auf Grund einer Erweiterung der verkalkten Bereiche in den einzelnen Skelettelementen gedrungener gebaut. In den Röhrenknochen der Extremitäten ist eine verstärkte Kalkeinlagerung besonders in den proximal wie distal in Richtung auf die Gelenke hin weiter ausgedehnten Knochenmanschetten festzustellen. Die deutlichste Förderung der Kalkeinlagerung aber ist im Achsenskelett zu verzeichnen: bei den Versuchstieren hat sich die Zahl der verknöcherten freien Rippen gegenüber den unbeeinflussten Larven verdoppelt, in einander entsprechenden Rippenpaaren ist die Kalkeinlagerung bei den Versuchstieren wesentlich intensiver.

Aus Larven von *Xenopus laevis* Daud., die 28 Tage alt im Zustand noch fast völligen Fehlens von Kalkablagerungen im Skelett durch vierzehntägige perkutane Thyroxinapplikation zur verfrühten Metamorphose gebracht wurden, entwickelten sich innerhalb von 23 Tagen Frösche mit verstärkter Kalzifikation (Abb. 2).

Im Schädel tritt die Förderung der Kalkeinlagerung nach Thyroxinbehandlung am auffälligsten hervor. Alle bei Kontrollen und Versuchstieren überhaupt verkalkten Skelettelemente zeigen bei den Thyroxintieren er-

heblich ausgedehntere Kalzifikationsareale. Sogar die in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittenen Kontrollen werden an Intensität der Kalkeinlagerung in den entsprechenden Schädelknochen von den Versuchstieren übertroffen. Bei diesen sind über solche graduellen Unterschiede hinaus in mindestens drei weiteren, bei den Kontrollen noch völlig kalkfreien Skelettelementen (Pterygoid, Squamosum, Vomer, bei einigen auch im Columellare) initiale Kalzifikationen eingetreten. In Wirbelsäule und Beckengürtel ist bei den Versuchstieren die Kalkeinlagerung in den auch bei Kontrollen schon vorhandenen Knochen, besonders in den Wirbelbögen und dem Ilium, verstärkt. In den Querfortsätzen des Sakralwirbels, den Kreuzbeinflügeln, ist nur bei Versuchstieren Kalk nachweisbar. Darüber hinaus kommt es auch in diesen Skelettabschnitten zur Bildung neuer Verkalkungszentren in den postsakralen Wirbelkörpern und im Ischium. In Schultergürtel und Vorderextremität ist die Zahl der verknöcherten Skelettelemente bei den Thyroxintieren zwar nicht vermehrt, die Kalkeinlagerung ist jedoch vor allem in den von Clavicula und Coracoid gebildeten Knochenspannen ausgedehnter. Die geringsten Unterschiede weisen die Hinterextremitäten auf. Zwar reichen die verkalkten Diaphysen nur bei den Versuchstieren völlig an die Gelenkköpfe heran, doch ist in diesem Skelettabschnitt, in welchem der Höhepunkt der Kalzifikation offenbar bereits auf einem frühen Entwicklungsstadium erreicht wird (KÄLIN und BERNASCONI⁵), keine wesentliche Förderung über die Norm hinaus erfolgt.

Deutlicher noch als beim Feuersalamander zeigen somit die am Krallenfrosch angestellten Untersuchungen, dass sich die Förderung der Verkalkung nach Thyroxinbehandlung in zweifacher Hinsicht äussert: 1. wird der auch bei der unbeeinflussten Entwicklung auftretende verkalkte Bereich der einzelnen Knochen erweitert, und 2. treten in anderen, bis dahin unverkalkten Skelettelementen neue Verkalkungszentren auf.



Abb. 2. Kalzifikation des Skeletts bei *Xenopus laevis* (Aufhellungspräparat, Alizarinfärbung), Vergrößerung 1,25 $\times$.
a Versuchstier (Thyroxin-Einwirkung), b Kontrolle.

Zur Feststellung des unmittelbaren Angriffsorts des Schilddrüsenhormons bei der Ablagerung von Kalksalzen im Stützgewebe wurden Thyroxin enthaltende

⁵ J. KÄLIN und A. BERNASCONI, Rev. Suisse Zool. 56, 359 (1949).

Agarstückchen bestimmter Grösse ($0,2 \text{ mm}^3$) in die rechte Hinterextremität von *Ambystoma mexicanum* implantiert (HARTWIG⁶). Das äussere Erscheinungsbild dieser Tiere wie auch der allgemeine Befund des Skeletts weisen darauf hin, dass das örtlich gesetzte Thyroxindepot sich nicht auf den Organismus in seiner Gesamt-

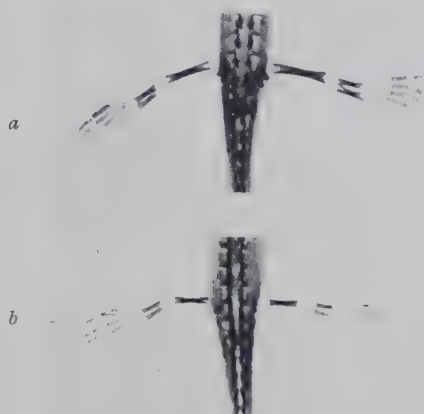


Abb. 3. Kalzifikationen der hinteren Extremitäten und der Sakralregion bei *Ambystoma mexicanum* (Aufhellungspräparat, Alizarinfärbung), Vergrösserung $1,25 \times$. a Förderung der Kalkeinlagerung durch Implantation von Thyroxin-Agar an den rechten Femur. b Unspezifische Entwicklungshemmung nach Implantation von reinem Agar an den rechten Femur.

heit ausgewirkt hat. In der das Thyroxinimplantat tragenden Extremität hingegen ist eine intensivere Kalk-einlagerung festzustellen: die Diaphysen sind länger, die Knochenhülsen stärker verknöchert (Abb. 3a). Auch die auf der Implantatseite gelegenen Teile des Beckengürtels nebst den betreffenden Sakralrippen erfahren eine weiter ausgedehnte Verknöcherung als die entsprechenden Skelettelemente der Gegenseite. Axolotl hingegen, bei denen zur Kontrolle ein Implantat aus reinem Agar ohne Thyroxinzusatz gesetzt wurde, lassen eine entsprechende Förderung der Kalkeinlagerung vermissen; vielmehr tritt als unspezifische Nebenwirkung der Operation in diesen Fällen eher eine örtliche Verzögerung in der Verknöcherung ein (Abb. 3b).

Die Veränderungen im Skelettsystem nach lokaler Thyroxinapplikation zeigen also, dass das Schilddrüsenhormon unmittelbar in den Prozess der Kalkablagerung eingreift.

Es ergibt sich somit, dass bei einer experimentell ausgelösten Entwicklungsbeschleunigung wie zum Beispiel die Epidermis so auch das skelettogene Gewebe auf das Schilddrüsenhormon und zwar durch intensivierten Einbau von Kalzium in die Knochen anspricht. Die Reaktionsbereitschaft der einzelnen Skelettelemente tritt auch hier zu verschiedenen Zeitpunkten auf (KUHN⁷). Es ist anzunehmen, dass im Verlauf der unbeeinflussten Amphibienmetamorphose die Schilddrüse bei dem Verkalkungsprozess des Skeletts eine entsprechende Rolle spielt.

O. KUHN und H. O. HAMMER

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 15. September 1955.

⁶ H. HARTWIG, Biol. Zentralbl. 60, 473 (1940).

⁷ O. KUHN, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen VI 7, 13 (1933).

Summary

Larvae of *Salamandra salamandra quadrigata* Dürigen and tadpoles of *Xenopus laevis* Daud, treated with a percutaneous application of thyroxin, show a more intensive calcification of their skeletal system after a precocious metamorphosis. The calcified area of bones is increased; additional centres of calcification can be distinguished in quite a number of other skeletal elements. By thyroxin-soaked agar implants in the hindlimbs of *Ambystoma mexicanum*, deposition of calcium salts is furthered in the bones of the leg treated, as well as in the adjacent pelvic girdle, thus demonstrating that the thyroid hormone exerts a direct effect upon calcification. It is supposed that during normal metamorphosis the thyroid gland plays an equal part in the process of calcification in the skeletal system.

Parathion Metabolism in Rat Liver and Kidney Slices

Parathion¹, when pure, is known not to inhibit cholinesterase *in vitro*². It is, however, changed in the organism to an active inhibitor of cholinesterase which has been identified as paraoxon³. This change was found to be enzymatic and to take place in the combined fractions of

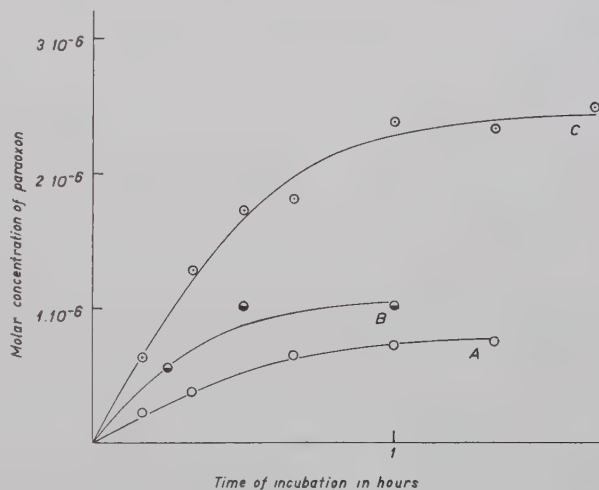


Fig. 1.—Accumulation of paraoxon with liver slices. Total volume 15 ml, concentration of parathion in A $1,18 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (dry weight of the tissue 92 mg), in B $2,36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (94 mg), in C $4,72 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (103 mg).

hepatic microsomes and the supernatant in the presence of oxygen⁴. Hepatectomy is known to give no protection to rats against the lethal effect of parathion⁵, and this suggested the possibility that the conversion into an active inhibitor of cholinesterase takes place in other organs than in the liver.

¹ OO-Diethyl-O-*p*-nitrophenyl-thiophosphate.

² W. M. DIGGLE and J. C. GAGE, Biochem. J. 49, 491 (1951).

³ J. C. GAGE, Biochem. J. 54, 426 (1953).

Diethyl-*p*-nitrophenylphosphate.

⁴ N. A. DAVISON, Biochem. J. 61, 203 (1955).

⁵ W. M. DIGGLE and J. C. GAGE, Nature 168, 998 (1951).

In experiments which are described in this paper, this conversion was studied in various tissues *in vitro* in order to obtain quantitative information of the effectiveness of the systems concerned. The development of anticholinesterase activity during incubation in oxygen atmosphere of tissue slices of female rats in the presence of various amounts of parathion was followed. Human red cell cholinesterase was used⁶, and its activity was measured manometrically. The inhibitory activity was calculated in terms of paraoxon using the experimentally obtained calibration curve. So far only liver and kidney tissue and the intestine have been found to produce a detectable amount of anticholinesterase activity under these conditions.

In liver slices, the inhibitory activity increased in the beginning of the experiment; however, it soon reached its final value and then did not change. This final concentration was not related to the amount of tissue, but was related to the concentration of the parathion present (Fig. 1). On the other hand, in kidney slices the inhibiting activity of the solution increased for a period of 2 h according to a curve which is almost a straight line, the slope of which is proportional to the amount of tissue (Fig. 2).

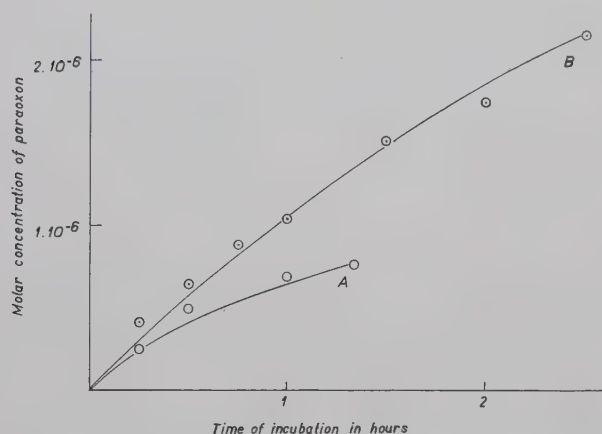


Fig. 2.—Accumulation of paraoxon with kidney slices. Total volume 15 ml, concentration of parathion $4.6 \cdot 10^{-5}$ M, dry weight of the tissue in A 73 mg, in B 202 mg.

The explanation of this difference was sought in different rates of splitting of the resulting inhibitor which is supposed to be identical with paraoxon in both tissues studied. The added paraoxon was metabolized rapidly by the rat liver and the reaction rate was proportional in the concentrations used to the amount of tissue and to the concentration of paraoxon; in the kidney, the splitting of paraoxon was considerably slower (Fig. 3).

It can therefore be assumed that during incubation of liver slices with parathion, the concentration of paraoxon in solution soon reaches a value at which the rate of its splitting is equal to the rate of its production. This value is constant during the experiment, since the concentration of parathion does not actually change. In the kidney, where the splitting of paraoxon is much slower, this steady state is not reached during the experiment.

The gut gives somewhat irregular results. Its effectiveness, however, certainly does not approach that of the

liver, which seems to be the organ most important in the metabolism of parathion.

The actual rate of the production of paraoxon can be calculated for the liver from the concentration at the steady state, when the rate of the production of paraoxon is equal to the rate at which it is being split. For the kidney it can be estimated from the slope of the initial part of the curve (Fig. 2).

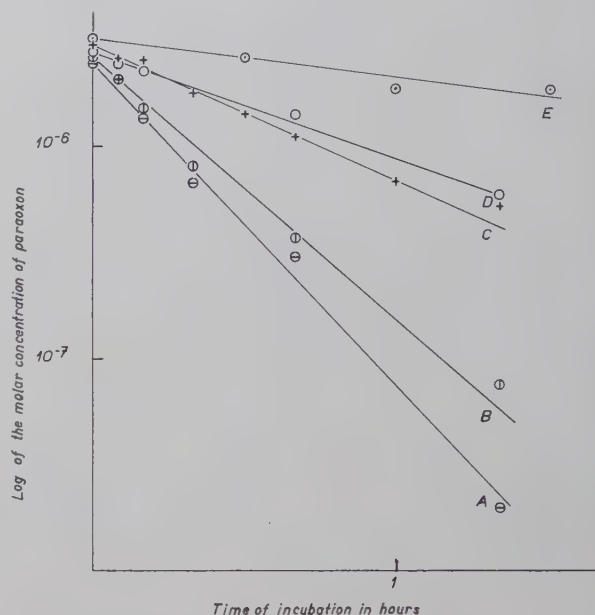


Fig. 3.—Splitting of paraoxon in liver (A, B, C, D) and kidney (E) slices. Total volume 15 ml, dry weight of the tissue in A 95 mg, in B 88 mg, in C 57 mg, in D 45 mg and in E 196 mg (both kidneys were cut quantitatively).

From these values and making certain assumptions, one can deduce approximatively the activity *in vivo* of the systems studied. If we assume that the lethal dose of parathion is diluted to the volume of the body of the animal, the resulting concentration will lie within the limit used on incubation with tissue slices in the experiments described. Under these conditions, the whole liver and kidney together with the intestine would change in one hour not more than 6% of the total parathion to paraoxon, which would be for the greater part further metabolized. This means that the half-time of this reaction is 12 h.

In view of the fact that in most cases death from parathion intoxication occurs within the first hour after injection, this may seem to be contradictory to the ratio of the lethal doses of these two substances, the LD_{50} for parathion being 4 mg/kg for female rats on intraperitoneal administration, and 1.2 mg/kg for paraoxon⁷. This apparent contradiction might be explained as follows. In paraoxon poisoning the substance is very rapidly split in the organism not only by liver and kidney but also in the blood⁸, and its concentration falls rapidly below the effective level so that the corresponding enzymatic systems of the organism are exposed to higher concentrations of the drug only for a relatively short time. In parathion poisoning, a low but steady

⁷ K. P. DU BOIS, J. DOULL, P. R. SALERNO, and J. M. COON, *J. Pharmacol.* 95, 79 (1949).

⁸ W. M. ALDRIDGE, *Biochem. J.* 49, 1 (1951).

⁶ J. E. GARDINER and B. A. KILBY, *Biochem. J.* 51, 78 (1952).

concentration of paraoxon is maintained in the blood for a longer period.

J. KUBIŠTOVÁ

Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Praha, January 31, 1956.

Zusammenfassung

Es werden quantitative Angaben über die Bildung von Paraoxon aus Parathion und seine weitere Aufspaltung durch Inkubation mit Leber- und Nierenschnitten und Rattendarm gemacht. Unter der Voraussetzung, dass die Inkubation der Gewebeschnitte im wesentlichen den Verhältnissen im Organismus entsprechen, würde das die Umwandlung bewirkende Enzymsystem im Verlaufe von 24 h etwa 75% des anwesenden Parathions zu Paraoxon überführen.

Antiallergische Wirkung bakterieller Polysaccharide

In früheren Arbeiten unseres Laboratoriums wurde die spezifische Wirkung bakterieller und anderer Polysaccharide auf die Chemotaxis der Leukozyten¹, die entzündlichen Reaktionen des Bindegewebes in Form des Fremdkörpergranuloms² und auf verschiedene Infektionsphänomene³ beschrieben. Auf Grund der vorliegenden Befunde schien es angezeigt, festzustellen, ob derartige Polysaccharide inmanche sind, andere Reaktionen des mesenchymalen Apparates, besonders anaphylaktische Phänomene, ebenfalls zu beeinflussen.

Es ergab sich, dass in bestimmter Weise aufgearbeitete Polysaccharide aus Bakterien die Erscheinungen eines typischen anaphylaktischen Schocks beim Meerschweinchen (Eieralbumin als Antigen, intravenös verabreicht) hemmen. Im allgemeinen wurden die Polysaccharide eine Stunde vor Auslösung des Schocks intraperitoneal injiziert. Einzelne der im anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens wirksamen Präparate unterdrücken überdies das beim sensibilisierten Kaninchen durch Pferdeserum ausgelöste Arthusphänomen (intravenöse Injektion 1 h vor der intrakutanen Injektion des Antigens). Zwischen der Wirkung in beiden Testen scheinen in dem verwendeten Dosenbereich keine gesetzmässigen Wechselbeziehungen zu bestehen, indem gewisse Polysaccharidpräparate entweder im einen Falle wirksam waren und nicht im andern, dagegen andere in beiden wirkten.

Die für eine Hemmung der allergischen Phänomene benötigten Dosen von Polysacchariden sind gering, indem 0,1–0,5 mg/kg i. p. und 0,1–1 γ /kg i. v. beim anaphylaktischen Schock und nur 0,01–0,05 mg/kg i. v. beim Arthusphänomen genügen. Sie sind wirksamer als bekannte Antiallergika, da Pyribenzamin als ein typischer Vertreter der Antihistaminika erst in etwa 10 bzw. 1000mal höheren Dosen den anaphylaktischen Schock hemmt und auch in noch höheren Dosen bei Prüfung am Arthusphänomen wirkungslos ist. Die Auf-

klärung ihres Wirkungsmechanismus erscheint deshalb von besonderem Interesse.

Eine direkte Wirkung gegenüber dem beim Schock freigesetzten Histamin oder eine Änderung der Histaminreaktivität ist auszuschliessen, da mit Polysacchariden behandelte Meerschweinchen wie auch die isolierten Organe solcher Tiere die gleiche Histaminempfindlichkeit wie unbehandelte aufweisen. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass andere mit der Anaphylaxie möglicherweise in Zusammenhang stehende humorale Faktoren wie 5-Hydroxytryptamin⁴ durch Polysaccharide beeinflusst werden; so wird das durch 5-Hydroxytryptamin-Aerosol erzeugte Asthma beim Meerschweinchen⁵ abgeschwächt. Die Wirksamkeit der Polysaccharide in diesem Test genügt jedoch nicht zur Erklärung der antianaphylaktischen Wirkung.

Wie andere bakterielle Polysaccharide bewirken auch die von uns untersuchten am Kaninchen eine nach relativ kurzer Zeit einsetzende Leukopenie, die durch relativ hohe Dosen eines Sympathikolytikums (Regitin) ebensowenig gehemmt wird wie die bekannte Erhöhung der Rektaltemperatur; von HUMPHREY⁶ ist gezeigt worden, dass eine allerdings auf andere Weise (Anti-Leukozyten-Serum) erzielte Leukopenie für die Hemmung des Arthusphänomens verantwortlich ist. Die Leukopenie kann aber kaum die alleinige Ursache der Wirksamkeit der Polysaccharide sein, indem nach wenigen Stunden eine Leukozytose mit Neutrophilie folgt, trotzdem eine einmalige Behandlung mit wirksamen Polysacchariden das Arthusphänomen während 48 h unterdrückt, das heisst während der vollen Dauer seiner möglichen Ausbildung.

Dass andere bekannte Auswirkungen der Polysaccharide, wie etwa Blutdrucksenkung oder Stimulation der Nebennierenrinde für die Schutzwirkung gegenüber den anaphylaktischen Reaktionen verantwortlich sind, erscheint vorläufig unwahrscheinlich, weil weder das blutdrucksenkende Hydralazin noch Corticosteroide eine vergleichbare Wirkung entfalten. Es erscheint dagegen nicht unwahrscheinlich, dass Beziehungen zu dem durch Typhusbazillen hervorgerufenen Zustand der «Promunität»⁷ und zum sogenannten Properdinsystem⁸ bestehen.

Polysaccharide dürften somit einen besonderen und komplexen, aus variablen Einzelkomponenten resultierenden Wirkungsmechanismus besitzen. Dies dürfte sich auch in ihrem Verhalten am Arthusphänomen zeigen, indem einzelne Polysaccharide nur einzelne Komponenten dieser besonderen Form der allergischen Entzündung (zum Beispiel Ödem, Blutung) hemmen oder sekundär zu einer Verstärkung führen können.

Ebenso komplexer Natur erscheint die Wirkung der Polysaccharide bei Prüfung am sogenannten Schwartzman-Phänomen (Kaninchen), indem sie je nach den Versuchsbedingungen sowohl präparatorische als auch provokatorische Eigenschaften besitzen und zudem das Phänomen selbst hemmen können. (Vgl. ALECHINSKY'S Versuche mit Filtraten von Colikulturen.⁹)

Eine einfache «Immunisierungsreaktion» kann ebenso nicht die Ursache der antianaphylaktischen Wirkung sein. Die Polysaccharide sind in Dosen, die ein Vielfaches

⁴ J. H. HUMPHREY und R. JAGUES, J. Physiol. 119, 43 P (1955); 128, 9 (1955).

⁵ H. HERXHEIMER, J. Physiol. 120, 65 P (1953).

⁶ J. H. HUMPHREY, Brit. J. exper. Path. 36, 268 und 283 (1955).

⁷ J. ORSKOV und F. KAUFFMANN, Z. Hyg. 119, 65 (1936).

⁸ G. PILLEMER, M. D. SCHOENBERG, L. BLUM und L. WURZ, Science 122, 545 (1955).

⁹ A. ALECHINSKY, Ann. Inst. Pasteur 82, 412 (1952).

¹ R. MEIER, Z. exper. Med. 87, 283 (1933). – R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953); 10, 376 (1954).

² R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exper. Path. Pharm. 224, 104 (1955).

³ R. MEIER und L. NEIPP, Schweiz. med. Wschr. 86, 249 (1956). – R. MEIER und F. KRADOLFER, Exper. 12, 213 (1956).

der antianaphylaktisch wirksamen darstellen, beim Meerschweinchen nicht antigen.

Die verschiedenen Polysaccharide führten beim Kaninchen in den verwendeten Dosen ebenfalls nicht zum Auftreten von in heparinisiertem Plasma in der Kälte ausfallendem Fibrinogen, wie es von anderer Seite¹⁰ nach sehr hohen Dosen von Polysacchariden aus *Serratia marcescens* beschrieben wurde; eine Veränderung dieses Gerinnungssystems dürfte somit kaum für die beobachtete Hemmung verantwortlich sein.

Auf Grund unserer Befunde erscheint die Annahme berechtigt, dass sich die Wirkung der Polysaccharide auf

¹⁰ L. THOMAS, R. T. SMITH und R. VON KORFF, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 86, 813 (1954).

ein neuartiges und eigenartiges physiologisches System erstreckt, welches die mesenchymale Abwehrreaktion entscheidend beeinflusst.

R. MEIER, H. J. BEIN und R. JAUQUES

Biologische Laboratorien, CIBA Aktiengesellschaft, Basel, den 28. März 1956.

Summary

It is shown that certain bacterial polysaccharides possess marked antianaphylactic properties. These hitherto unknown effects, which are not due to a change in sensitivity to histamine, result from a complex and peculiar mechanism of action.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

COGITATIONES

Die Tuberkulose in ihrer Beziehung zu Individuum und Gesellschaft

Von H. BIRKHÄUSER, Basel*

Alles, was wir bei wachem Bewusstsein vor uns sehen, zeigt zunächst eine helle, klare Seite, welche sich der rational-naturwissenschaftlichen Analyse zugänglich erweist. Es bewahrt aber auch stets einen dunklen, unzugänglichen und deshalb unverständlichen Anteil, wobei es gleichgültig ist, ob wir ihn für «noch nicht» aufgeklärt halten, oder ob wir der Meinung sind, er berge Realitäten, welche dem Verstand verschlossen bleiben. Im ersten, überblickbaren Feld zeigen sich regelmässige Beziehungen zwischen den Dingen und ihren Bestandteilen. Diese Relationen lassen sich bisweilen zu Gesetzen verdichten, welche zutreffende Voraussagen gestatten und uns sogar das Recht verleihen, in den Gang der Ereignisse einzugreifen, wenn sich bedrohliche Entwicklungen anzeigen.

Auch die menschliche Gestalt ist zu einem Teil überblickbar, und wenn sich in diesem hellen Bezirk Regelmässiges, Arttypisches herausstellt, so nehmen wir uns das Recht heraus, es gleichfalls in Gesetze zu fassen und allenfalls darauf zu dringen, dass sich jedermann in ihren Grenzen halte. Innerhalb dieses gesetzmässig abgesteckten Raumes muss das Individuum auf Freiheit verzichten, wenn es sich in Gegensatz zu wichtigen, allgemein verbindlichen Forderungen stellt. Jenseits dieser Zone liegt jedoch sein rational unbestimmbarer Anteil – der unerhellte Bezirk seiner Persönlichkeit, der vor allem ihm selbst gehört. Weil niemand stichhaltige Aussagen über seine Inhalte zu machen vermag, verfügt auch nie-

mand über das Recht, unmittelbar in diesen Raum der persönlichen Freiheit einzugreifen.

Es könnte die Frage erhoben werden, was diese allgemein gehaltene Einleitung mit dem Thema der Tuberkulose zu schaffen habe. Es ist darauf zu antworten, dass die Medizin, in deren Rahmen unser Gegenstand gehört, ohnehin eine Stufe der Entwicklung erreicht hat, auf welcher sie sich in vermehrter Masse mit solchen Allgemeinheiten beschäftigen muss, und es ist überdies zu hoffen, dass die Antwort aus den folgenden Ausführungen hervorgehen wird.

Nachdem Wissen und Unwissen sogar in der vornehmsten der exakten Naturwissenschaften – der Physik – hart aufeinanderstossen und mancher darüber beunruhigt ist, dürfen wir uns um so freimütiger gestehen, dass das seit jeher in ausgesprochener Weise für die Medizin gegolten hat, insbesondere für ihr Teilgebiet der Infektionskrankheiten und in diesem natürlich auch für die Lehre von den tuberkulösen Erkrankungen.

Bis weit in die zweite Hälfte des letzten Jahrhunderts blieb sowohl dem Tuberkulösen als auch seinem Arzt nicht viel mehr übrig, als den Verlauf der Krankheit als ein unverstandenes Schicksal abzuwarten. In der grossen Zeit der Bakteriologie wurde jedoch ein säurefester Bazillus als ihr Erreger entdeckt, und man hatte damit zwar eine elementare, aber doch grundsätzlich wichtige Stufe der Kenntnis erreicht: ohne Tuberkelbazillus gibt es keine Tuberkulose.

Als eine negative Aussage fordert dieses Gesetz zur Umkehr in eine positive auf, die folgendermassen lautet: die Gegenwart von Tuberkelbazillen im Organismus bedingt regelmässig Erkrankung an Tuberkulose. Man scheint wirklich mit einer solchen direkten Kausalbeziehung gerechnet zu haben, denn anders wäre das grosse Aufsehen nicht verständlich, welches im Jahre 1900 die bekannte Publikation von NÄGELI¹ machte.

* Tuberkulosefürsorgestelle.

¹ O. NÄGELI, Über Häufigkeit, Lokalisation und Ausheilung der Tuberkulose, Virch. Arch. 160, 426 (1900).

Durch die Untersuchung der Lungen zahlreicher Personen, die an nichttuberkulösen Krankheiten verstorben waren, erbrachte er den Beweis, dass die meisten Menschen mehr oder weniger ausgedehnte tuberkulöse Entzündungen durchgemacht haben, ohne sich dessen gewahr geworden zu sein. Die negative Aussage lässt sich also nicht ohne weiteres in eine positive umkehren, das heisst, die Infektion zieht die Erkrankung nicht notwendig nach sich, sondern es sind weitere Faktoren erforderlich, damit es dazu kommt – eine Tatsache übrigens, die für die meisten Infektionskrankheiten gilt.

Kaum war somit die erste Stufe erreicht und die Ursache der Tuberkulose ins Licht gerückt worden, so zeigten sich neue, unverständliche Verhältnisse, und man darf wohl sagen, dass sie bis heute nicht aufgeklärt worden sind.

Immerhin ist seither manches präzisiert worden. So erhob sich zunächst etwa die Frage, ob die Auslösung der Tuberkulose als *Krankheit* nicht einfach die Folge der Infektion durch ausnehmend *viele* oder durch besonders *bösartige* Keime sei, während der Organismus *wenige* oder verhältnismässig *gutartige* Bazillen in Schranken zu halten vermöge.

Wirklich ist es nicht schwer, Beispiele anzuführen, welche für derartige unmittelbare quantitative und allenfalls auch qualitative Relationen sprechen, und es sei hiezu auf das folgende Beispiel verwiesen² (Abb. 1).



Abb. 1. Streukreis eines Lungentuberkulösen.

(Die dunkel gezeichneten Stellen in den obigen Lungenschemata bezeichnen erkrankte Lymphdrüsen, die schraffierten Partien Erkrankungen des Brustfells. – Bei den Fällen mit X ist auch die Lunge ergriffen. – Mitte: tuberkulöser Streuer).

Diese Beobachtung entspricht jedenfalls den Vorstellungen, die man sich von einer Infektionskrankheit macht, und sie lässt sich nicht allein am Einzelfall, sondern auch auf breiterer Basis bestätigen. Die Forschergruppe des britischen Royal College of Physicians³ beob-

achtete beispielsweise ein besonders gut ausgewähltes Kollektiv von rund 10 000 Personen – vorwiegend Krankenschwestern – während mehrerer Jahre. Die Auswirkungen der verschieden starken Infektionsgefahr oder Exposition ist eindeutig, wie das aus dem folgenden Schema hervorgeht.

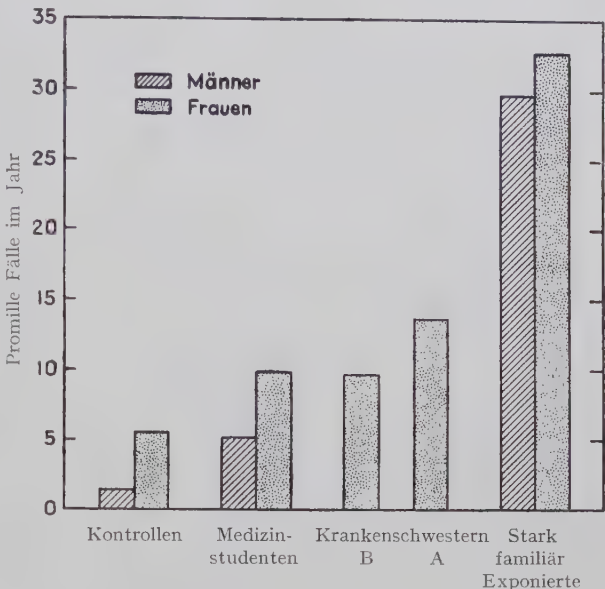


Abb. 2. Tuberkulose-Morbidität nach Beginn der Kontrolluntersuchungen.

Es besteht somit eine quantitative Beziehung zwischen Exposition einerseits und Erkrankungshäufigkeit andererseits, und es lässt sich erwartungsgemäss zeigen, dass sie auch zwischen der Exposition und der blossen Infektion *ohne* Erkrankung besteht. Wir sind nämlich in der Lage, auf einfache Weise zwar nicht den kranken vom gesunden Organismus zu unterscheiden, wohl aber den infizierten vom *nicht*infizierten. Nach der Aufnahme von Tuberkelbazillen in die Gewebe entwickelt sich nach einem allgemeinen immunologischen Gesetz eine Überempfindlichkeit (Allergie) auf das eingedrungene artfremde Eiweiss, welche sich durch Injektion derselben Eiweissart in die Haut durch eine lokale Entzündung kundgibt (Tuberkulinreaktion). Werden derart Gruppen von Personen untersucht, welche in verschieden starkem Ausmass der Infektion ausgesetzt waren, so lassen sich Resultate von der in Abbildung 3 dargestellten Art gewinnen.

Auch die bloss *Aufnahme* von Bazillen in die Gewebe verhält sich somit proportional zur Menge der angebotenen Keime, und wir finden damit zugleich durch eine immunologische Methode bestätigt, was NÄGELI um 1900 durch direkte Untersuchung der Lunge festgestellt hat: dass die Mehrzahl der gesunden, erwachsenen Städter tuberkulös infiziert ist.

Dass *qualitative* Unterschiede zwischen den Tuberkelbazillen bestehen, ist seit langem bekannt und neuerdings besonders von BLOCH untersucht worden, wobei interessante Befunde erhoben werden konnten⁴. Virulenzbestimmungen bei menschlicher Tuberkulose sind jedoch umständlich, und es ist überdies nie gelungen, eine

² Nach E. UEHLINGER, Schweiz. med. Wschr. 1943, 769.
³ *Tuberculosis in Young Adults*. Report on the Proffit Tuberculosis Survey 1935–1944. MARC DANIELS, F. RIDEHALGH, V. H. SPRINGETT und I. M. HALL (H. K. Lewis & Co. Ltd., London 1948). Dieser ausgezeichneten Publikation sind auch die Abbildungen 2, 3 und 4 entnommen.

⁴ H. NOLL, *The Chemistry of Cord Factor, a Toxic Glycolipid of M. Tuberculosis*, Adv. Tuberc. Res. 7, 149–183, S. Karger, Basel/New York (1956).

regelmässige Beziehung zwischen der Bösartigkeit der Bazillenstämme und der Verlaufsform der Krankheit zu finden. Es besteht deshalb vorläufig wenig Aussicht, das Problem der Anfälligkeit des Menschen von dieser Seite aus zu lösen.

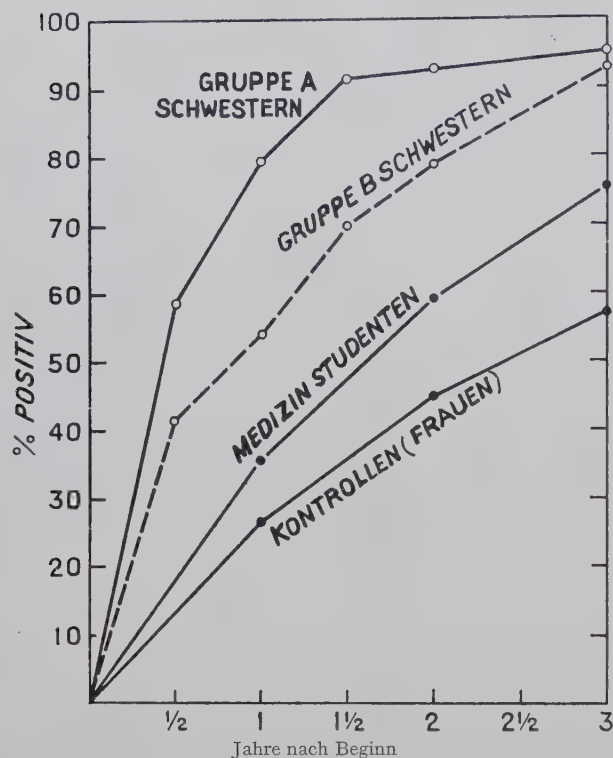


Abb. 3. Prozentsatz der Personen, welche zu Beginn der Kontrollperiode tuberkulinnegativ waren und im Verlauf der folgenden 3 Jahre positiv wurden.

Nun fällt auf, dass die Zahl der Infektionen diejenige der Erkrankungen bedeutend übersteigt. Eine unmittelbare quantitative Beziehung zwischen den beiden Ereignissen verliert damit an Wahrscheinlichkeit. Man weiss, dass das für zahlreiche derartige Krankheiten gilt, und glaubte die Erklärung darin zu finden, dass eine erste, vielleicht leichte Infektion *Immunität* erzeugt. Um die Jahrhundertwende, als NÄGELI seine Befunde publizierte, stand die Immunologie in hoher Blüte. v. BEHRING hatte soeben die Heilwirkung seines Diphtherieserums mitgeteilt, und man scheint allgemein unter dem Eindruck gestanden zu haben, alle Infektionskrankheiten seien nächstens durch immunologische Methoden sowohl vermeidbar als auch heilbar.

Dass sich nach dem Eindringen von Tuberkelbazillen in den Körper gleichfalls Immunitätsphänomene nachweisen lassen – in erster Linie die Tuberkulinreaktion –, ist soeben festgestellt worden. Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts glaubte ROBERT KOCH selbst, im Tuberkulin eine Substanz in der Hand zu haben, mit welcher sich die Tuberkulose durch Immunisierung heilen lasse. Wie hoch gespannt die Erwartungen damals waren, geht daraus hervor, dass der Überbringer des ersten Tuberkulins nach Davos polizeilich vor dem Enthusiasmus des Publikums geschützt werden musste. Der Traum verfiel leider rasch, aber der Gedanke, das Wesen der latenten, gutartigen Infektion wie auch der Heilung allein durch immunologische Vorgänge verstehen zu können, ist bis heute lebendig geblieben. Wirk-

lich stellt sich auch heraus, dass nichtinfizierte (gegen Tuberkulin negative) Personen eine höhere Morbidität aufweisen als gleich grosse Gruppen gesunder, tuberkulin-positiver Individuen. Dies geht aus der folgenden schematischen Darstellung hervor:

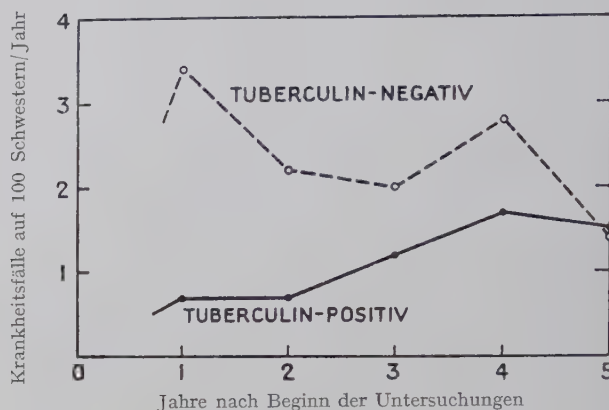


Abb. 4. Die Morbidität der Individuen, welche zu Beginn der Untersuchungen positiv reagierten, im Vergleich zu derjenigen der tuberkulinnegativen.

Obwohl die beiden Gruppen nicht ohne weiteres vergleichbar sind, so zeigen sie doch einen deutlichen Unterschied zugunsten der anfänglich Infizierten, und man darf deshalb annehmen, es seien immunologische Veränderungen bei der infizierten Gruppe daran schuld.

Es wäre jedoch befriedigender, über ähnliche Erhebungen an sicher vergleichbaren Kollektiven zu verfügen. Hierzu eignet sich die *künstliche* Infektion der einen Hälfte von zahlreichen, tuberkulin-negativen Individuen, die danach alle während mindestens eines Jahres beobachtet werden. Als Krankheitskeim wählt man mit Vorteil den *Bacille Calmette-Guérin* – abgekürzt BCG – einen abgeschwächten Stamm, der alle Eigenschaften der frei vorkommenden Stämme besitzen soll mit Ausnahme der pathogenen. Gefährliche Eigenschaften können ihm kaum mehr zugeschrieben werden, und er ist deshalb nach den allgemeinen Grundsätzen der aktiven Schutzimpfung millionenweise angewandt worden.

Nun lässt sich aber der Beweis, dass sich derart Immunität erzielen lasse, wesentlich schwerer erbringen, als man das von vornherein glauben könnte. Da niemand behauptet, der Schutz sei vollständig, und deshalb auch bei Geimpften mit einzelnen gewöhnlichen Erkrankungen an Tuberkulose gerechnet werden muss, und da ferner die Morbidität an sich niedrig ist, so sind Vergleichsgruppen aus mindestens 2000–3000 Personen erforderlich. Diese wiederum homogen zu finden und überdies lange Zeit regelmässig nachzukontrollieren, erfordert einen sehr bedeutenden organisatorischen Aufwand. Es sind denn auch anfänglich Verstösse gegen die Grundsätze der statistischen Untersuchung vorgekommen, welche dem wissenschaftlichen Ansehen der Methode vorübergehend schaden. Es bleiben nur wenige, neue Publikationen übrig, welche über einwandfreie Resultate berichten. Es sei daraus diejenige zweier nordischer Autoren⁵ herausgegriffen, welche rund 30 000

⁵ G. DAHLSTRÖM und H. DIFS, *The Efficacy of B. C. G. Vaccination*, Acta tuberc. scand. Suppl. 27 (1951). – G. DAHLSTRÖM, *Tuberculosis in B. C. G. Vaccinated and Non-Vaccinated Young Adults*, Acta tuberc. scand. Suppl. 32 (1953).

geimpfte schwedische Rekruten neben etwa 28 000 ungeimpften während längerer Zeit geduldig beobachteten.

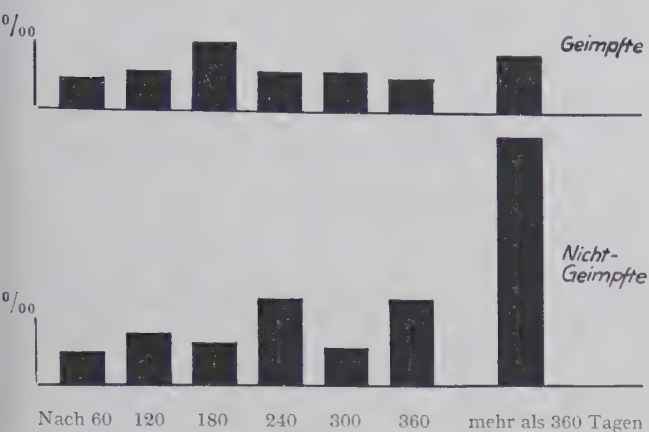


Abb. 5. Morbidität an postprimärer Tuberkulose bei Geimpften und Nichtgeimpften (in Promille).

(Das obige Schema gibt nur den Einfluss der Impfung auf die Morbidität an postprimärer Lungentuberkulose wieder. Auf die Reproduktion weiterer Beobachtungen der schwedischen Forscher wird aus Raumgründen verzichtet.)

Die geringere Morbidität der Geimpften ist damit statistisch einwandfrei nachgewiesen und man hat ausserdem Grund zur Annahme, dass die früher so gefürchteten, letalen Formen der Krankheit – die Hirnhautentzündung und die Miliartuberkulose – bei ihnen nicht mehr auftreten.

In der Praxis ist auch der relative Schutz der BCG-Impfung anzustreben, denn es ist nicht gleichgültig, ob von 1000 Individuen 3 im Jahr an Tuberkulose erkranken, oder ob es nur eines ist, und vor allem ist es natürlich sehr erwünscht, die schweren Komplikationen vermeiden zu können. In theoretischer Hinsicht muss jedoch zugegeben werden, dass weder die natürlich erworbene noch die künstlich erzeugte Immunität jener Faktor ist, welcher die Gesundheit des infizierten Individuums mit Sicherheit garantiert.

Wie soeben erwähnt worden ist, erkranken nämlich unter heutigen Verhältnissen alljährlich etwa 1–3‰ der Erwachsenen regelmässig an Lungentuberkulose. Bei diesen Fällen, von denen ein erheblicher Anteil bei routinemässiger Untersuchung der Bevölkerung entdeckt wird, gelingt es nur ausnahmsweise, eine Infektionsquelle zu finden. Diese Tatsache steht im Widerspruch zu weitverbreiteten Vorstellungen von der Entstehung der Tuberkulose, und ebenso interessant ist das weitere Faktum, dass man bei solchen Reihenuntersuchungen auf etwa zehnmal mehr Personen stösst, welche die röntgenologischen Zeichen für erhebliche, ausgeheilte tuberkulöse Lungenprozesse aufweisen, ohne je in merkbarer Weise krank gewesen zu sein.

Wenn nun die Immunität das Krankheitsgeschehen wohl im günstigen Sinne beeinflusst, aber nicht in entscheidender Weise hintanzuhalten vermag, hängt die Gesundheit danach lediglich von den quantitativen Verhältnissen bei der Infektion ab, wie es nach den obigen Ausführungen den Anschein haben könnte? Es drängt sich doch die Frage auf, weshalb zahlreiche Individuen tuberkulös werden, ohne dass selbst bei lückenloser Kontrolle ihrer Umgebung eine Infektionsquelle ermittelt werden kann, und es ist ebenso merkwürdig, dass andere gesund bleiben, welche sicher Gelegenheit zu schwerer Infektion hatten.

Die Voraussetzungen zur Erkrankung sind somit weniger einfach, als es anfänglich scheinen konnte, und es empfiehlt sich deshalb, die epidemiologischen Befunde mit kritischerem Blick nochmals zu überprüfen.

Die Entdeckung von drei rosettenartigen Gruppen von infizierten und später ausserdem erkrankten Soldaten (siehe Abb. 1) gab Anlass zur Durchleuchtung der gesamten schweizerischen Armee, und wirklich wurden unter den rund 500 000 Personen nahezu 1000 weitere, bisher unbekannte Tuberkulosefälle entdeckt – merkwürdigerweise aber keine einzige, weitere Gruppe von Kranken⁶. Dieses Resultat wird in der folgenden Abbildung dargestellt.

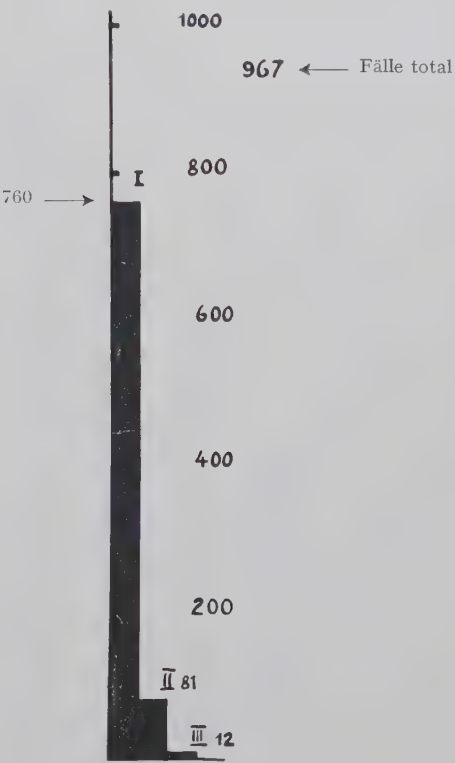


Abb. 6. Häufigkeit der neuentdeckten Fälle von Lungentuberkulose in der schweizerischen Armee pro militärische Einheit. I: 1 Fall pro Einheit. II: 2 Fälle pro Einheit. III: 3 Fälle pro Einheit.

Die Tuberkulose ist und bleibt eine Infektionskrankheit. Es muss aber zugestanden werden, dass die Fälle zahlreicher sind, in welchen es trotz fliessender Infektionsquelle zu keiner neuen Erkrankung in der Umgebung kommt. Dieser auffallende Sachverhalt lässt sich besonders deutlich am Beispiel der gesunden Ehegatten von bazillären Tuberkulösen darstellen. Die epidemiologische Situation ist in diesem Falle ja von modellhafter Eindeutigkeit, und es liegen deshalb auch mehrere, gründliche Untersuchungen darüber vor. Wirklich weisen die anfänglich gesunden Ehepartner eine um etwa 20–30mal höhere Morbidität auf als die Durchschnittsbevölkerung. Was bedeutet aber dieses Verhältnis? Wenn unter gewöhnlichen Umständen von 1000 Personen etwa 1–3 im Jahre erkranken, so sind es unter 1000 Ehegatten von Tuberkulösen etwa 20–90 – eine Zahl, welche gewiss alle gebräuchlichen prophylak-

⁶ Bericht über die Armee-Reihendurchleuchtung von 1934–1944, Vjschr. Schweiz. Sanitätsoffiziere (1945).

tischen Massnahmen rechtfertigt. Wie verhält es sich aber mit den 910–980 anderen Ehepartnern, welche trotz gleicher Exposition *nicht* erkranken und deshalb aus unseren Erwägungen gewiss nicht ausgeschlossen werden dürfen? Niemand wird ernstlich behaupten wollen, sie seien alle zufälligerweise von der Infektion verschont und allein deswegen gesund geblieben. Eine solche Vermutung erscheint von vornherein äusserst unwahrscheinlich und kann wohl als widerlegt gelten, wenn wir die Auswirkung der Exposition auf Infektion und Morbidität in Erwägung ziehen, wie sie im folgenden Schema an Hand der Befunde des schon mehrfach zitierten englischen Royal College of Physicians dargestellt sind.

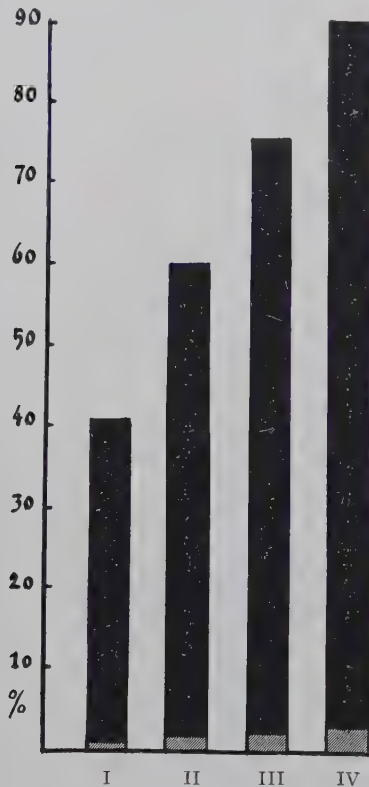


Abb. 7. Beziehung zwischen Infektions- und Erkrankungshäufigkeit, kombiniert aus Abbildung 2 und 3. I: Kontrollen (Frauen).

II: Medizinstudenten. III: Krankenschwestern A, B. IV: Stark familiär Exponierte.

(Schwarz: Infizierte, Schraffiert: Kranke)

Wohl bleibt also die Infektion die unerlässliche Voraussetzung zur Entstehung der Tuberkulose als Krankheit. Sie kann den Ausbruch unter gewissen Umständen sogar erzwingen. Es ist deshalb nach wie vor grosse Vorsicht in der Umgebung bazillärer Kranker notwendig, besonders für Kinder und Jugendliche. Sieht man jedoch von den dramatischen Einzelfällen ab, welche jeweils grosses Aufsehen erregen und betrachtet man das Ergebnis der Beobachtung ganzer Gruppen solcher Fälle, so tritt deutlich hervor, dass unter Ausnahme des Säuglingsalters einer unmittelbaren kausalen Verkettung von Infektion und Krankheit enge Grenzen gezogen sind.

Bei genauerem Zusehen hat es sich somit erwiesen, dass die *quantitativen Verhältnisse* bei der Infektion wohl grundsätzlich wichtig sind und in einzelnen Fällen auch bedenkliche Auswirkungen zur Folge haben können, dass aber die *entscheidenden* Voraussetzungen, von denen

Gesundheit oder Krankheit des einzelnen Falles abhängen, bis heute *unbekannt* geblieben sind. Auch die Untersuchung der *immunologischen* Veränderungen, die sich im Anschluss an die Erstinfektion einstellen, hat keine Aufklärung gebracht. Es bleibt nichts anderes übrig, als den Zustand der *Gesundheit* von einer *Resistenz* abhängig zu erklären, deren Mechanismus gänzlich im Dunkel liegt, und von einer *Disposition* zu sprechen, wenn die Gewebe mit *krankhaften Veränderungen* auf die Gegenwart der Tuberkelbazillen reagieren.

Es ist damit lediglich auf recht elementare Befunde hingewiesen worden. Einesteils geschah dies, um einem konkreten Beispiel zu zeigen, wie nahe unter der sichtbaren Oberfläche eines ungemein intensiv bearbeiteten Spezialgebietes die weiten, durchaus realen, aber gänzlich undurchsichtigen Regionen der menschlichen Persönlichkeit beginnen, auf welche zu Beginn hingewiesen worden ist. Hier so wenig als irgendwo im Bereich der Naturwissenschaften und insbesondere der Biologie liegen Kenntnisse über die *wesentlichen* Vorgänge innerhalb der untersuchten Objekte vor. Es ist deshalb stets ein Merkmal der Halbbildung und der ideologischen Verworfenheit, wenn vom Menschen so geredet wird, als sei er gänzlich durchschaut und damit restlos verfügbar. Es ist andernteils Wert darauf gelegt worden, hervorzuheben, dass das Wenige, das wir über die Verlaufstendenz der menschlichen Tuberkulose wissen, ausschliesslich auf dem Ergebnis *statistischer* Erhebungen beruht.

Sobald also Gruppen von 1000 und mehr Personen zur Diskussion stehen, so lassen sich präzise Angaben über diese Kollektive als *Ganze* machen. Keinem einzigen, konkreten Individuum kann jedoch sein persönliches Schicksal mit Sicherheit vorausgesagt werden – weder dem Rekonvaleszenten nach einer Sanatoriumskur, noch gar dem Gesunden, der lediglich tuberkulös infiziert ist. Den *Einzelnen* so zu behandeln, als wäre seine Zukunft *bekannt* und damit *statistische* Erkenntnisse auf die *Individualprognostik* anzuwenden, ist zweifellos ein grober Verstoss gegen die Logik. Solche Verstösse sind aber dennoch immer häufiger anzutreffen.

Es sei zugegeben, dass beim stabilisierten Tuberkulose-Patienten während der ersten Jahre nach Abschluss der Behandlung mit einem erheblichen Prozentsatz von Rückfällen gerechnet werden muss. Die Rekonvaleszenten müssen deshalb einige *potentielle* Eingriffe in ihre persönliche Rechtssphäre hinnehmen, die sich in erster Linie versicherungstechnisch geltend machen. Es sollte aber nicht so sein, dass unversehens die volle Versicherungsfähigkeit zur Voraussetzung der *Beschäftigungsmöglichkeit* gemacht wird. Primär ist das Recht auf Arbeit, und die Versicherung ist eine fakultative, untergeordnete Abmachung. Es zeugt für eine höchst sonderbare Verwirrung der Geister, wenn in der Praxis die Verhältnisse auf den Kopf gestellt werden und man unbedenklich das Primäre dem Sekundären unterordnet, wie das immer häufiger vorkommt. Ein eigentliches Skandalon entsteht aber, wenn diese hypertrophische Sekuritätspraxis nicht mehr allein die ehemaligen Kranken erfasst, sondern sogar auf voll leistungsfähige Gesunde übergreift, die ehemaligen Kranken durch einzelne Merkmale lediglich *gleichen*.

Es soll damit noch von den *gesunden* Trägern röntgenologisch nachweisbarer Lungennarben die Rede sein, welche nie manifest krank gewesen sind. Sie werden immer häufiger ermittelt, seitdem die bekannten, routinemässigen radiologischen Kontrollen von Bevölkerungsgruppen eingeführt worden sind. In der Schweiz werden jährlich mindestens 500 000 präsumptiv gesunde Personen (rund $\frac{1}{10}$ der Einwohner) einem solchen diagnostischen Verfahren unterworfen (Schirmbilder, Durchleuchtungen). Man findet dabei ausser den erwarteten,

bisher unbekannten, behandlungsbedürftigen Tuberkulösen etwa 10mal mehr Individuen mit den soeben erwähnten Narbenbildungen.

Was diese 5000–10000 Personen vom Durchschnitt abhebt, lässt sich von jenen Verdichtungen des Lungengewebes *nicht* unterscheiden, welche nach behandeltem aktiver Tuberkulose zurückbleiben. Ein Arzt, dem nur ein Röntgenbild vorliegt, kann somit nichts darüber aussagen, ob es sich um den Film eines ehemaligen Patienten handelt oder ob er von jemand stammt, der nie in merkbarer Weise krank war. Im allgemeinen wird man auf ärztlicher Seite dazu neigen, auf ein früheres, offensichtlich Leiden zu schliessen, das günstig verlaufen und in Heilung ausgegangen ist. Wird diese Vermutung vom Untersuchten jedoch negiert, so geht der Privatarzt nach mehr oder weniger grossem Erstaunen in der Regel zur Tagesordnung über und lässt die Sache auf sich beruhen. Der Amts- oder Vertrauensarzt hingegen, von dem oft mehr verlangt wird, als er mit Sicherheit beantworten kann, neigt nicht selten dazu, die ungünstigere der beiden Möglichkeiten anzunehmen und den Untersuchten zu verdächtigen, er verschweige die früher abgelaufene Krankheit. Der Arzt gerät damit in Gefahr, das was *ist* zu vermengen mit dem was *sein könnte*, und wirklich hat sich in aller Stille – sozusagen aus Vorsicht und auf dem Rücken des Publikums – die Sitte eingeschlichen, von der Ähnlichkeit einzelner diagnostischer *Zeichen* auf diejenige der gesamtpersönlichen *Prognose* zu schliessen.

Mögen nun auch ziemlich genaue Zahlen über die Prognose von *Kollektiven* bekannt sein, die sich aus ehemaligen Tuberkulosepatienten zusammensetzen, so verfügen wir über keine derartigen Angaben über das durchschnittliche Schicksal gesunder Narbenträger. Ist es deshalb schon gewagt, den einzelnen Rekonvaleszenten auf Grund statistisch ermittelter Kenntnisse zu beurteilen, so liegt eine manifeste Sinnlosigkeit vor, ihn selbst dann unter die Gefährdeten einzureihen, wenn nicht einmal *statistische* Kenntnisse über das Ausmass der Gefährdung vorliegen.

Dies geschieht offenbar immer dann, wenn sich ein Gesunder unversehens beispielsweise von der Einreise in einen fremden Staat ausgeschlossen sieht, nachdem er alle Beziehungen zur Heimat gelöst hat, seine Familienangehörigen unter Umständen schon abgereist sind und er selbst die Fahrkarte in der Tasche trägt. Einem anderen wird ein Gesuch um Einbürgerung abgelehnt, von dem vielleicht eine entscheidende Anstellung abhängt, wie denn oft berufliche Aufstiegsmöglichkeiten verloren gehen, weil vorgezogen wird, einen Menschen nicht nach seinen persönlichen Qualitäten zu beurteilen, sondern als den Repräsentanten eines vermeintlichen Risikos.

Es erhebt sich deshalb die ernste Frage, unter welchen Umständen es überhaupt statthaft sei, jemand nicht auf Grund des präzisen *Wissens*, sondern der Erwägung von *Wahrscheinlichkeiten* hier und jetzt *de facto* empfindlich zu schädigen, obwohl niemand in der Lage ist, vorzusagen, *ob* und *wann* die erwogene *Möglichkeit* je *Wirklichkeit* wird. Von der freien Abmachung des Geschäftslebens sehen wir ab, wie sie etwa beim Abschluss einer privaten Lebensversicherung getroffen wird. Niemand erleidet ernstlichen Schaden, wenn die Versicherungsgesellschaft finanzielle Bedingungen stellt, welche den Abschluss der vorgesehenen Vereinbarung verhindern. Ganz anders verhält es sich aber mit jenen medizinisch-wissenschaftlich verbrämten Entscheiden, denen sich der Einzelne unter Bedingungen fügen *muss*, von denen soeben einige erwähnt worden sind. Sie lassen sich nur unter der einen Bedingung rechtfertigen, dass die Gesell-

schaft als Ganzes unter allen Umständen vor einer dringenden Gefahr geschützt werden muss, oder aber der Wert des Individuums erweist sich als so weit abgesunken, dass mit ihm je nach Belieben ohne die Notwendigkeit einer Rechtfertigung manipuliert werden kann.

Wirklich könnte der Ausbruch einer möglichen Krankheit für die Allgemeinheit so gefährlich sein, dass sie damit gar nicht rechnen *darf*. Der Risikoträger muss deshalb aus höherem Interesse ausgeschaltet werden, ehe er das befürchtete Unheil gebracht hat. Das war die Rechtfertigung der alten Leprosorien und sonstigen Siechenhäuser wie auch der modernen Quarantäne. Im Unterschied zur Diffamierung wegen Tuberkulose-*Verdacht* – es ist hier nicht mehr die Rede von der *Krankheit* – ist die Quarantäne jedoch zeitlich eng begrenzt und bringt keinen weiterreichenden Schaden.

Wird somit ein Träger tuberkulöser Narben, der nie manifest krank war, im freien Wettbewerb im oben angedeuteten Sinne empfindlich geschädigt, so liegt kein rational beweisbarer Grund vor, weshalb ihm dieser Schaden zugefügt werden müsse, denn es lässt sich nicht darlegen, dass er weitere Kreise oder auch sich selbst ernstlich gefährde. Offenbar *fällt es nicht mehr auf*, dass ihm Ungereimtes passiert. Wenn sich solche Fehlhandlungen im praktischen Leben ereignen und wenn sie vor allem stillschweigend hingenommen werden, so ist das ein Symptom für das Versagen der übergeordneten ethischen Kontrolle.

Wir erinnern uns nämlich, dass sich die westlich-christliche Kultur durch die Lehre auszeichnet, jeder Einzelne sei eine kleine Entsprechung des im wesentlichen unverständlichen und wunderbaren Ganzen. Einer der grossen Theologen formulierte sie folgendermassen: «Die Seele hat etwas in sich, ein Fünkeln der Wahrheit, das niemals erlischt.»⁷ Als Träger dieses Fünkels hat jeder wenigstens grundsätzlich sein eigenes, unabdingbares Daseinsrecht, das den Ansprüchen der Allgemeinheit wie auch den Übergriffen der Willkür der Einzelnen entgegensteht und nicht ohne Not verletzt werden darf.

Es erfüllt mit Sorge, dieses Recht auch bei uns um kleine Stücke abbröckeln zu sehen, und stets sind auch die Vorwände zur Hand, welche seinen Abbau bagatellisieren. Unter ihnen tritt am häufigsten das Argument auf, die Einschränkung der persönlichen Freiheit sei zur Sicherung der allgemeinen Wohlfahrt erforderlich. Es ist zu hoffen, dieses sanfte Abgleiten sei kein Vorzeichen jener anderen Mentalität, die uns aus den folgenden Sätzen eines zeitgenössischen Staatsmannes entgegentritt: «Selbst den Ärzten fehlt die richtige Einschätzung für die Notwendigkeit der Produktion. Überall stösst man noch auf die philanthropische, liberale und falsche Ansicht, die Hilfe und Unterstützung des Individuums sei die Hauptaufgabe... Notwendig ist der Schutz der Produktion. Schäden an der Gesundheit des Arbeiters sind nicht so wichtig wie wirtschaftliche Schäden der Produktion...»⁸

Damit ist die Liquidation der Individualrechte indirekt ausgesprochen, und unter solchen Umständen ist die Frage wirklich gegenstandslos, ob ein persönlicher Anspruch auf die Wahrung einer eigenen Rechtssphäre Rücksicht verdiene oder nicht. Was ehemals unter dem Zeichen eines abgeklärten Glaubens an transzendente

⁷ ECKART: «Diu sêle hât etwaz in ir, ein fûnkeln der redelicheit, daz niemer erleschet...» (WILH. WACKERNAGEL, Deutsches Lesebuch, 1. Teil, Basel 1869).

⁸ Ministerpräsident ZAPOTOCKY in einer Rede vom 9. November 1951, zitiert nach «Spectator», London, in «Monat», Nr. 86, S. 73.

Mächte vom Einzelnen allenfalls gefordert werden durfte und unter das Schicksalsmässige, dem rechnenden Zugriff Entzogene gereiht worden ist, wird hier nun nach seiner Säkularisation gänzlich ins Diesseitige gezogen und trotzdem für absolut, ein für allemal richtig ausgegeben.

Im Gegensatz hiezu sollten wir, so lange wir können, eine andere, folgerichtige Haltung vertreten. Es ist hier gezeigt worden, dass selbst in einem kleinen, medizinischen Spezialgebiet die Grenzen der naturwissenschaftlich belegbaren Tatsachen eng gezogen sind. Sie treten neben den unerforschten Realitäten – die somit *frei* von jeglichem Anspruch bleiben – um so schärfer hervor, je konsequenter eine rationale Methodik gepflegt wird. Wir gewinnen dabei das tröstliche Wissen, dass unsere alte, westliche Lehre von der Unantastbarkeit wesentlicher Bezirke jedes einzelnen Menschen grundsätzlich zu Recht besteht – und zwar genau so lange, als wir unserer wissenschaftlichen Tradition treu bleiben.

Summary

In confidential medical service, it has become the custom to judge the individual according to criteria which have been won from statistical studies on groups of people. This is a violation of the fundamental principles of logic and of scientific methods in general. So long as it is only a question of a free agreement between the doctor and the subject of the examination (as in the case of private life insurance), there is no objection; but when the vital interests of the subject examined depend upon the result of the examination (as in the case of immigration, choice of profession, nationalisation, marriage, etc.), then this procedure is a serious abuse. The individual must not *de facto* be put at a disadvantage by calculations based on probability. This situation is discussed in relation to the prognosis of tuberculous processes in man.

STUDIORUM PROGRESSUS

Eine neue morphologische Deutung des Vogelgehirns auf Grund neuer Forschungsergebnisse

Von W. STINGELIN*, Basel

Neuere vergleichende Untersuchungen über das Vorderhirn bei Tag- und Nachtraubvögeln verlangen nach einer Überprüfung der anatomischen Gliederung des Grosshirns der Vögel¹. Im folgenden soll kurz die Entwicklung dieses Spezialgebietes bis zum gegenwärtigen Stand dargestellt werden.

Es ist vor allem das Verdienst KAPPERS'², dass er aus dem bis zu seiner Zeit Bekannten ein befriedigendes und allgemeingültiges Schema der Kerngebiete und Faserzusammenhänge ableiten konnte und dass er durch eine einheitliche Nomenklatur die Basis zu einer besseren gegenseitigen Verständigung legte. Seine Folgerungen können etwa wie folgt zusammengefasst werden:

Das Vorderhirn der Vögel ist, verglichen mit Säugetier und Reptil, ausgezeichnet durch eine starke Ver-

grösserung jener Gebiete, die bei den übrigen Amnioten die Basalganglien ausmachen. Durch diese extreme Entwicklung der basalen Teile wird die corticale Entfaltung unterdrückt. Das Gebiet, das mit dem Neopallium der Säugetiere zu homologisieren ist, das Hyperstriatum, differenziert striatal und verwächst mit den Basalganglien. Durch diese Verwachsung wird das Ventrikelsystem auf einen schmalen medialen und laterocaudalen Spalt reduziert. Rindenartige Gebiete, denen aber nur eine ganz untergeordnete Funktion zugesprochen werden kann, sind auf die Dorso-Mediane und auf den Bereich der Area praeopyriformis beschränkt. Die tieferliegenden Gebiete wie Neostriatum, Archistriatum und Paläostriatum sind subpallial und entsprechen in genannter Reihenfolge dem Nucleus caudatus + Putamen, Nucleus amygdalae und Globus pallidus der Säugetiere.

Im Anschluss an die Ergebnisse KAPPERS' führen die gefundenen neueren morphologischen, biometrischen und embryologischen Tatsachen zu einer Modifikation der Kappersschen Auffassung.

Die morphologischen Arbeiten stammen fast ausnahmslos von Amerikanern. HUNTER³, DURWARD⁴ und CRAIGIE⁵ bearbeiteten das Gehirn vom Kiwi, ein Gehirn, dessen archaische Erscheinung und relativ starke Ausprägung von Rindenzonen die Hypothese aufkommen liess, dass stammesgeschichtlich gesehen innerhalb der Vögel mit der Evolution eine Cortexreduktion einhergeht. CRAIGIE⁶ verfolgte diese Hypothese weiter und konnte auf breiter Vergleichsbasis zeigen, dass bei Neognathen der Cortex im allgemeinen schwächer ausgebildet ist als bei Paläognathen.

Die Arbeit von HUBER und CROSBY⁷ bringt neue Beiträge zum Problem der zonalen Differenzierung. Es ist das spezielle Verdienst dieser Autoren, dass die Gliederung der Sperlinghemisphäre an einer Reihe ausgezeichnete serienmässiger Darstellungen in eindrücklicher Weise dokumentiert wird, und dass auf die spezielle Differenzierung und die wahrscheinlichen Faserbeziehungen dieser Gebiete hingewiesen wird. Bisher konnte die von HUBER und CROSBY vorgeschlagene Einteilung bei Huhn, Papagei, Taube, Schwalbe, Mauersegler und bei den Tag- und Nachtraubvögeln nachgewiesen werden.

Die Zerebralisationsstudien PORTMANNS⁸ haben auf biometrischer Grundlage gezeigt, dass der Massenanteil des Grosshirns der Vögel, bezogen auf den vegetativen Anteil des Gehirns, der als Stammrest abgegliedert werden kann, in der systematischen Reihe gesetzmässigen Variationen unterworfen ist. PORTMANNS Indexwerte, die zwischen 2,4 und 28 variieren, weisen mit aller Deutlichkeit darauf hin, dass das allgemeine und einfache Vogelhirnschema nur mit Vorsicht aufzunehmen ist und dass erst die genaue Kenntnis der gestaltlichen Variation zu einem vertieften Verständnis des Grosshirns der Vögel führen kann. Der Massenanteil dieses obersten Integrationsortes weist bei ranghohen und rangniederen Formen ähnlich grosse Differenzen auf wie bei Säugetieren.

Von grundlegender Bedeutung sind die erst in neuerer Zeit erschienenen embryologischen Arbeiten KALLÉNS⁹. Dieser Autor konnte nachweisen, dass, verglichen mit

* Zoologisches Institut der Universität Basel.

¹ W. STINGELIN, 1955 (im Druck).

² C. U. A. KAPPERS, *Die vergleichende Anatomie des Nervensystems der Wirbeltiere und des Menschen*, 2 Bd., 2. Abschn. (De Erven F. Bohn, Haarlem 1921), S. 1036; *Anatomie comparée du système nerveux* (Masson et Cie., Paris 1947).

³ J. J. HUNTER, *Proc. Acad. Sci.*, Amsterdam 26, 807 (1923).

⁴ A. DURWARD, *J. Anat.* 66, 437 (1932).

⁵ E. HORNE CRAIGIE, *J. comp. Neur.* 49, 223 (1930).

⁶ E. HORNE CRAIGIE, *J. comp. Neur.* 73, 179 (1940).

⁷ G. HUBER CARL und E. G. CROSBY, *J. comp. Neur.* 48, 1 (1929).

⁸ A. PORTMANN, *Etudes sur la cérébralisation chez les oiseaux*, I und II, *Alauda* 14 (1946); 15 (1947).

⁹ B. KALLÉN, *Acta Anat.* 17, 72 (1954).

der Säugetierhemisphäre, sämtliche Kerngebiete der Vogelhemisphäre, mit Ausnahme des Paläostriatum augmentatum und primitivum, den neopallialen Anteilen beim Säugetiergehirn entsprechen. Diese am Taubenhirn dokumentierten Tatsachen stellen, bezogen auf den Anteil phylogenetisch älterer zu phylogenetisch jüngeren Gebieten am Hemisphärenvolumen, das Vogelvorderhirn auf die gleiche Ebene mit dem Säugetiervorderhirn.

Nicht nur die speziell der Vogelhemisphäre gewidmeten Arbeiten, auch die Ergebnisse der neueren Verhaltensforschung mahnen zur Zurückhaltung bei einer zu einfachen Beurteilung der Vogelhemisphäre.

Das differenzierte Verhalten der Vögel, der Reichtum ihrer Beziehungen zu Umwelt und Artgenossen, deutet auf Erlebensweisen hin, die nur durch die Annahme eines entsprechend komplexen Koordinationszentrums verstanden werden können.

Auch die Analyse der Zuordnung bestimmter Tätigkeiten des Organismus im Nervenzentrum hat ergeben, dass nur bei Verletzung des Paläostriatums (KALISCHER¹⁰) schwere sensorische und motorische Störungen auftreten, während bei Ausfall der diesem Ganglion übergeordneten Zentren Mängel auftreten, die man versucht hat zu beschreiben mit Worten wie «Verminderung des Ausdrucks, Ausfall der Aufmerksamkeit, Verlust der Erkenntnisfunktion, Verlust der spontanen, auf Gedächtniserscheinungen beruhenden Bewegungen usw.»

Die Extirpationsversuche führen zur Annahme, dass die Hauptmasse der Hemisphäre einer höheren Funktion dient, die das Erleben und Verhalten des Tieres zu einem sinnvollen Ganzen zusammenfasst.

Meine eigenen Untersuchungen zeigen, dass auch bei einer besonders hochzerebralierten Form (Waldkauz, Index 17) jene Differenzierung und Felderung, die HUBER und CROSBY dargestellt haben, in ähnlicher Weise auftritt. Der Anteil der hyperstriatalen Bezirke ist aber bei den Eulen viel grösser und die Differenzierung der dorsal der Lamina frontalis superior liegenden Ganglienzone viel schärfer als bei den bisher bekannten Formen. Eine Folge dieser starken Ausprägung des Wulstgebietes ist die nicht zufällige, sondern innere Verhältnisse widerspiegelnde Dorsalfurche, die Valleculla, welche die laterale Grenze zwischen Hyperstriatum dorsale und ventrale markiert und bei allen mir bekannten Formen eine homologe Furche darstellt.

Das Eulengehirn zeigt eine mögliche Form der Elevation der Hemisphäre: Auf der einen Seite eine starke Massenzunahme des Hyperstriatums, auf der andern Seite eine scharfe Trennung und Ausprägung seiner Unterabschnitte.

Diese Differenzierung, die bei den Eulen parallel der Elevation an Ausprägung zunimmt, ist bisher unterschätzt worden: Einmal, weil sie in der scheinbar einfacheren Form der räumlichen Durchgliederung und nicht wie beim Säugetiercortex in flächiger Entfaltung realisiert ist, die der technischen Interpretation leichter zugänglich ist, zum andern, weil im allgemeinen bisher Formen untersucht wurden, bei denen die schichtartige Gliederung nicht in dieser Schärfe und Mächtigkeit auftritt wie bei den Eulen.

In Abbildung 1 ist ein Querschnitt durch die Mitte der Waldkauzhemisphäre abgebildet, der die ausserordentliche Differenziertheit zur Darstellung bringen soll. Die Zellen sind stark vergrössert und schematisiert eingezeichnet, stehen aber in richtigem relativem Grössenverhältnis zueinander.

Extirpationsversuche weisen darauf hin, dass diese, bei Vögeln und Säugern einander genetisch entsprechen-

de neopalliale Zone analoger Funktion zugeordnet ist, und auch die Ergebnisse der Verhaltensforschung lassen bei den Vögeln ein Substrat der Steuerung erwarten, das weder in Ausdehnung noch in Differenzierung jenem der Säugetiere nachsteht.

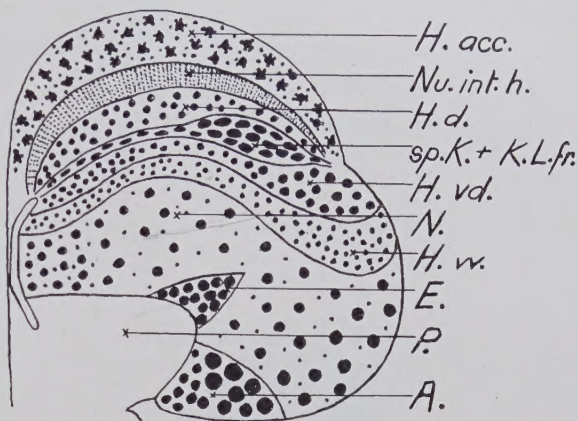


Abb. 1. Transversalschnitt durch die Mitte der Waldkauzhemisphäre, schematisiert. Die Zellen sind in richtigem relativem Grössenverhältnis dargestellt.

Abkürzungen: A. Archistriatum, B. Ektostriatum, H. acc. Hyperstriatum accessorium, H. d. Hyperstriatum dorsale, H. vd. Hyperstriatum ventrodorsale, H. vv. Hyperstriatum ventroventrale, K. L. fr. Kern der Lamina frontalis superior, N. Neostriatum, Nu. int. h. Nucleus intercalatus hyperstriati, P. Paläostriatum, sp. K. spindel-förmiger Kern.

Dass eine solche Differenzierung zum mindesten bei hochzerebralierten Formen aufgefunden werden kann, dokumentiert Abbildung 1 am Beispiel der Eulen. Ich möchte betonen, dass auch bei den Vögeln von einer Schichtung spezifischer Zellzonen gesprochen werden kann, ähnlich jener Schichtung, die auch in andern Integrationsorten auftritt, wie im Cortex der Säuger und im Mittelhirndach der Vögel und Reptilien. Die 6-Schichtung des Hyperstriatums darf somit ebenfalls als typische Integrationsstruktur interpretiert werden.

Schliesslich weisen die biometrischen Ergebnisse von PORTMANN auf eine weitere Entsprechung der Vögel mit den Säugern hin: In der systematischen Reihe treten ebenfalls rangniedere und ranghohe Typen auf. Es sind auch hier die neopallialen Bezirke, welche die starke Variation der Hirnmasse bedingen.

Auch die Tatsache, dass die Verhältniszahl Hemisphärentgewicht zu Körpergewicht bei flugfähigen Vögeln grösser ist als bei entsprechend schweren Säugern, ist bedeutungsvoll. Sie weist darauf hin, dass der Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen nicht als Rangunterschied aufgefasst werden darf, sondern dass dieser in einer Sonderentwicklung besteht, die bei den Vögeln in einer intensiven dreidimensionalen Durchgliederung realisiert ist, während sie bei den Säugern in der mehr flächigen Entfaltung des genetisch entsprechenden Bezirkes zum Ausdruck kommt.

Die qualitative Sonderentwicklung und weitgehende Differenziertheit der Vogelhemisphäre ist in der vorliegenden Mitteilung besonders betont worden. Da diese Differenzierung und Gliederung gerade jene Gebiete betrifft, die dem Neopallium der Säugtiere entsprechen, darf man erwarten, dass trotz der qualitativen Verschiedenheit der morphologische Vergleich zwischen

¹⁰ O. KALISCHER, Abh. königl. preuss. Akad. Wiss. 4, 1 (1905).

Säugercortex und Vogelstriatum auf dieser neuen Basis zu positiveren Ergebnissen führt, als es im Lichte der älteren Auffassung möglich war.

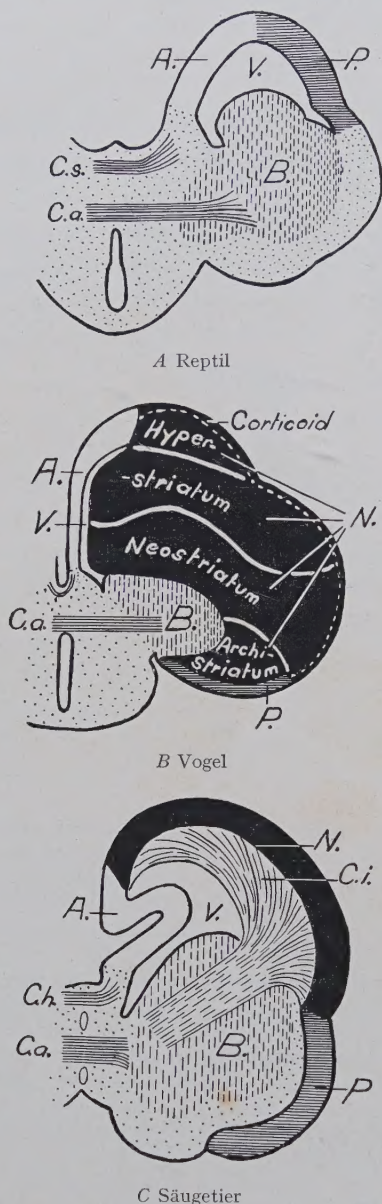


Abb. 2. Die Anteile von Archi-, Paläo- und Neopallium am Gehirn der Amnioten, dargestellt im Lichte der neuen Auffassung.

Abkürzungen: A. Archipallium, B. Basalganglien, C. a. Commissura anterior, C. h. Commissura hippocampi, C. i. Capsula interna, C. s. Commissura superior, N. Neopallium, P. Paläopallium, V. Ventrikel. (A + C nach PORTMANN.)

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse, die von verschiedenen Standorten aus seit den dreissiger Jahren zum Vogelhirnproblem beigetragen wurden, legen eine Modifikation der Kapperschen Auffassung nahe, die vor allem auch durch die embryologischen Arbeiten KALLÉNS gestützt wird.

Abbildung 2 zeigt am Reptilien-, Vogel- und Säugerhirn die Ausdehnung der neopallialen Bezirke im Lichte der neuen Auffassung. Der Massenanteil der Basalganglien ist, verglichen mit der Masse des Neopalliums, bei den Vögeln ausserordentlich gering. Diese Darstellung zeigt deutlich, dass, stammesgeschichtlich gesehen, die Vögel, wie die Säuger, je eine Eigenentwicklung durchgemacht haben, die beim Vogel zum massigen, beim Säugetier zum rindenartigen Bauplan führte.

Summary

The embryological fact (KALLÉN) that hyperstriatum, neostriatum and archistriatum in birds are homologous to the neopallium, palaeostriatum primitivum and augmentatum to the basal ganglions of the mammals, is made probable by recent results in the fields of morphology, physiology and animal psychology.

The differentiation and form of the neopallial parts of the birds brain is not produced by a surface development, as in mammals, but in a three dimensional structure of the hemisphere, by mass in birds.

This differentiation is strongly pronounced in highly cerebralized forms, and the stratified arrangement of the elements is to be interpreted as a structure of integration.

With regard to function and organization, the neopallium of birds is strictly comparable to that of mammals.

Congressus

SUISSE

II. Internationales Symposium über Kondensationskerne

In Basel und Locarno (Schweiz) wird vom 1. bis 5. Oktober 1956 das II. Internationale Symposium über Kondensationskerne durchgeführt. Anmeldungen zur Teilnahme und zu den Vorträgen sind bis zum 15. Juli 1956 an Dr. M. BIDER, Astronomisch-Meteorologische Anstalt der Universität Basel in Binningen (Schweiz), zu richten.

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acy lanid

Cedilanid

Digilanid

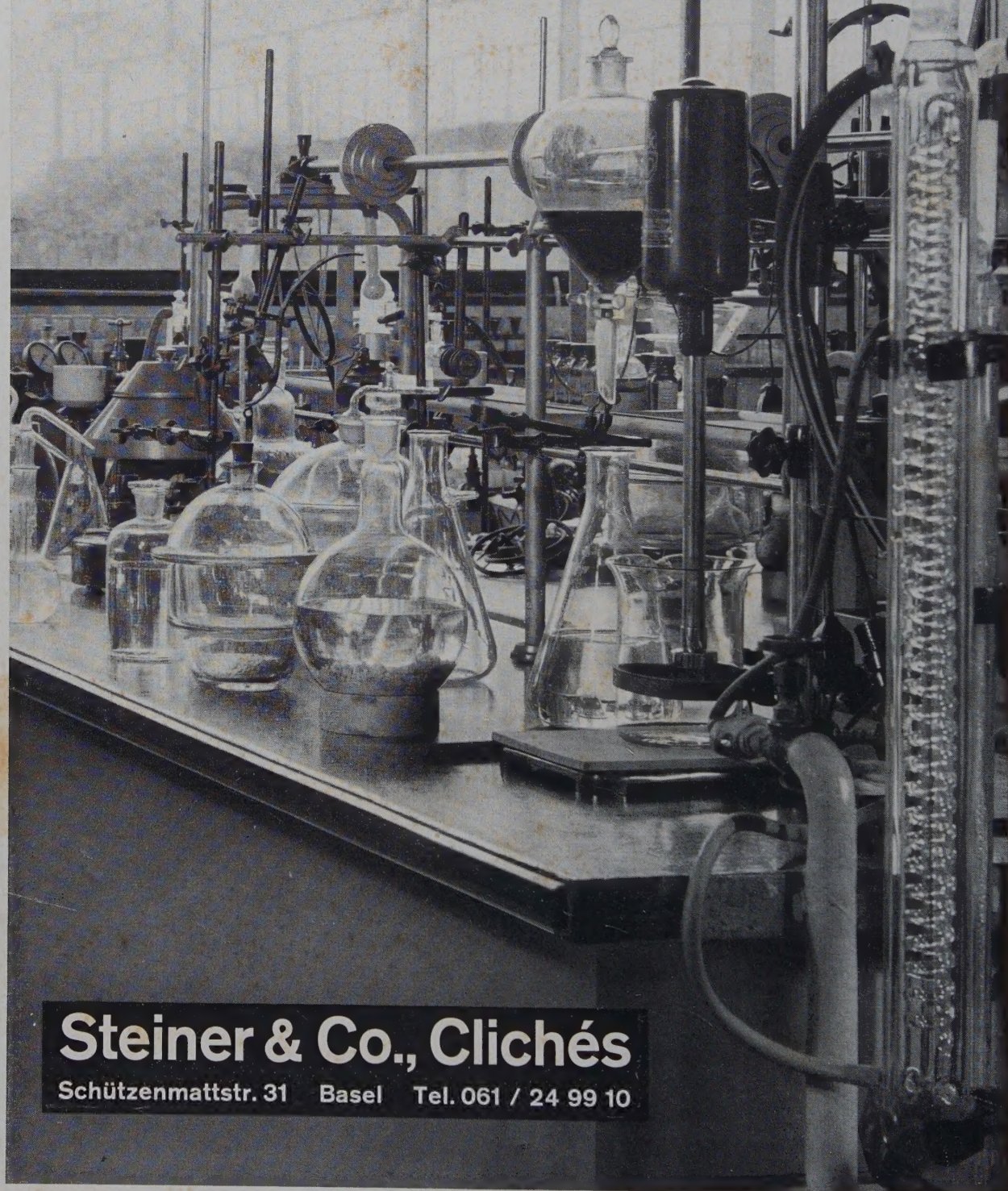
Scillaren

Strophosid



S A N D O Z A . G .

Clichés für Wissenschaft,
Technik und Industrie



Steiner & Co., Clichés

Schützenmattstr. 31 Basel Tel. 061 / 24 99 10